

Heterogenität respiratorischer Leukozyten-Subpopulationen unter  
besonderer Berücksichtigung dendritischer Zellen in  
Inzuchtmausstämmen im gesunden Tier und unter Infektionsbedingungen

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sabine Kranz  
aus Siegen

Gießen 2013

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitäts-  
klinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Lohmeyer  
Gutachter: Prof. Dr. med. Holger Hackstein

Tag der Disputation: 7.5.2014

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie der Lunge . . . . .	1
1.2	Pneumonie . . . . .	3
1.3	Klebsiella pneumoniae . . . . .	4
1.4	Klebsiellen als Erreger nosokomialer Infektionen . . . . .	5
1.5	Mausmodell der Pneumonie . . . . .	7
1.6	Immunabwehr der Lunge . . . . .	10
1.6.1	Mechanische Abwehr . . . . .	10
1.6.2	Alveolarmakrophagen und Granulozyten . . . . .	11
1.6.3	Dendritische Zellen . . . . .	12
1.7	Pulmonale Subpopulationen Dendritischer Zellen . . . . .	13
1.8	Fragestellung . . . . .	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Materialien . . . . .	17
2.1.1	Geräte und Zubehör . . . . .	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial . . . . .	19
2.1.3	Versuchstiere . . . . .	20
2.1.4	Antikörper . . . . .	21
2.1.5	Beads . . . . .	25
2.1.6	Chemikalien . . . . .	25
2.1.7	Zytokin-, Protein- und Intracellular Staining Kits . . . . .	26
2.1.8	Puffer und Medien . . . . .	27
2.1.9	Arzneimittel . . . . .	28
2.2	Methoden . . . . .	28
2.2.1	Tierhaltung und Tierversuche . . . . .	28
2.2.2	Murine Zellisolation . . . . .	28
2.2.2.1	Gewinnung von murinem Lungenhomogenat . . . . .	28
2.2.2.2	Broncho-alveoläre Lavage (BAL) . . . . .	28

2.2.2.3	Anreicherung von murinen Zellsubpopulationen mit Hilfe der Magnetic Cell Separation (MACS) . . . . .	29
2.2.3	In vitro Assays und Zellkulturmethoden . . . . .	29
2.2.3.1	Paraformaldehyd (PFA) Fixierung von Zellmaterial . .	29
2.2.3.2	CFSE Markierung . . . . .	29
2.2.3.3	Transgenes Modell der T-Zellproliferation . . . . .	30
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	31
2.2.4.1	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) . . . . .	31
2.2.4.2	Messung von Zytokinen in Zellüberständen mittels Cytometric Bead Array . . . . .	31
2.2.4.3	Proteinbestimmung aus der BAL . . . . .	32
2.2.5	Durchflusszytometrische Methoden . . . . .	32
2.2.5.1	Durchflusszytometrie . . . . .	32
2.2.5.1.1	Mehrfach-Färbung leukozytärer Subpopulationen . . . . .	34
2.2.5.1.2	Makrophagen und Granulozyten . . . . .	34
2.2.5.1.3	Lymphozyten . . . . .	34
2.2.5.1.4	Lineage-negative CD90 <sup>+/neg</sup> Leukozyten . . .	37
2.2.5.1.5	Dendritische Zellen . . . . .	37
2.2.5.1.6	Bestimmung absoluter Zellzahlen mit TruCount Tubes . . . . .	37
2.2.5.2	Zellsorting . . . . .	38
2.2.5.2.1	Sort definierter DC-Subpopulationen sowie Vergleichspopulationen aus der murinen Lunge . .	39
2.2.5.2.2	Sort naiver T-Zellen aus transgenen OVA-Mäusen . . . . .	39
2.2.6	Mikrobiologische Methoden . . . . .	39
2.2.6.1	Herstellung von <i>Klebsiella pneumoniae</i> Stocks . . . . .	39
2.2.6.2	Herstellung von <i>Klebsiella</i> Lysat . . . . .	40
2.2.6.3	Intra-tracheale Applikation von <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	40
2.2.7	Immunhistologische Auswertung <i>Klebsiella pneumoniae</i> -infizierter Lungen . . . . .	41
2.2.8	Statistische Auswertung der Messergebnisse . . . . .	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Heterogenität der respiratorischen leukozytären Subpopulationen und Dendritischen Zell-Subsets in Inzucht-Mausstämmen . . . . .	43
3.1.1	Vergleich der Gesamtleukozyten, respiratorischen Makrophagen, DC und Granulozyten . . . . .	43

3.1.2	Vergleich der respiratorischen DC-Subpopulationen . . . . .	43
3.1.3	Vergleich der respiratorischen Lymphozyten . . . . .	44
3.1.4	Vergleich der Zytokinproduktion von respiratorischen Lymphozyten nach Stimulation . . . . .	45
3.1.5	Vergleich der respiratorischen regulatorischen T-Zellen . . . . .	46
3.2	Quantitative Analyse leukozytärer Subpopulationen in der experimentellen <i>Klebsiella</i> -Pneumonie in C57BL6/N Mäusen . . . . .	47
3.2.1	Nachweis der Manifestierung einer gram-negativen Pneumonie . . . . .	47
3.2.1.1	Allgemeines . . . . .	47
3.2.2	Gesamtleukozyten, Makrophagen, Gesamt-DC und Neutrophile in der Lunge . . . . .	48
3.2.2.1	Histologische Befunde . . . . .	50
3.2.3	Quantitative Bestimmung respiratorischer DC-Subpopulationen in der experimentellen <i>Klebsiella</i> -Pneumonie . . . . .	51
3.2.3.1	CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> MHCII <sup>neg/low</sup> , CD11b <sup>hi</sup> MHCII <sup>hi</sup> DC, CD103 <sup>+</sup> DC und pDC . . . . .	51
3.3	Verifizierung der Analyse plasmazytoider DC . . . . .	52
3.3.1	Analyse der Expression von SiglecH und mPDCA-1 . . . . .	52
3.3.2	Analyse der IFNalpha Produktion . . . . .	53
3.4	Antigenpräsentation und T-Helferzellproliferation durch definierte, <i>Klebsiella</i> -aktivierte DC-Subpopulationen . . . . .	53
3.5	Charakterisierung der Expression von Aktivierungsmarkern auf DC-Subpopulationen . . . . .	54
3.5.1	CD86 und MHCII . . . . .	54
3.6	Charakterisierung der Zytokinexpression respiratorischer Leukozyten nach Behandlung mit dem TLR7 Liganden Imiquimod und folgender Stimulation durch <i>Klebsiella pneumoniae</i> . . . . .	58
3.6.1	Allgemeines . . . . .	58
3.6.2	Expression von Interferon-gamma, TNF-alpha, Interleukin-10, Interleukin-2 und Interleukin-12p70 unter dem Einfluss von Imiquimod und <i>Klebsiella</i> -Lysat . . . . .	58
4	Diskussion . . . . .	61
4.1	Heterogenität der respiratorischen leukozytären Subpopulationen und DC-Subsets in Inzucht-Mausstämmen . . . . .	61
4.1.1	Heterogenität der respiratorischen DC-Subpopulationen . . . . .	62
4.1.2	Heterogenität der Granulozyten . . . . .	63
4.1.3	Heterogenität der respiratorischen Lymphozyten . . . . .	64

4.1.4	Funktionelle Unterschiede respiratorischer Leukozyten nach T-Zell- sowie nach TLR4- und TLR7- Aktivierung . . . . .	64
4.2	Heterogenität respiratorischer DC in der experimentellen <i>Klebsiella</i> -Pneu- monie von C57BL6/N Mäusen . . . . .	65
4.2.1	Expression der Aktivierungsmoleküle CD86 und MHCII auf de- finierten respiratorischen DC-Subpopulationen . . . . .	67
4.2.2	Respiratorischen DC-Subpopulationen zeigen stark heterogenes Potential zur Aktivierung und Proliferationsinduktion von T-Hel- ferzellen . . . . .	69
4.2.3	Funktionelle Rolle der pDC in der gram-negativen <i>Klebsiella</i> -Pneu- monie . . . . .	70
4.3	Immunologische Modulation der Zytokinexpression respiratorischer Leu- kozyten nach Behandlung mit dem TLR7 Liganden Imiquimod während der <i>Klebsiella pneumoniae</i> Infektion . . . . .	71
Zusammenfassung		<b>i</b>
Summary		<b>iii</b>
Abkürzungsverzeichnis		<b>v</b>
Abbildungsverzeichnis		<b>vii</b>
Tabellenverzeichnis		<b>x</b>
Literaturverzeichnis		<b>xii</b>
Publikationsliste		<b>xxv</b>
Erklärung zur Dissertation		<b>xxvii</b>
Danksagung		<b>xxix</b>
Lebenslauf		<b>xxxi</b>

# 1

## Einleitung

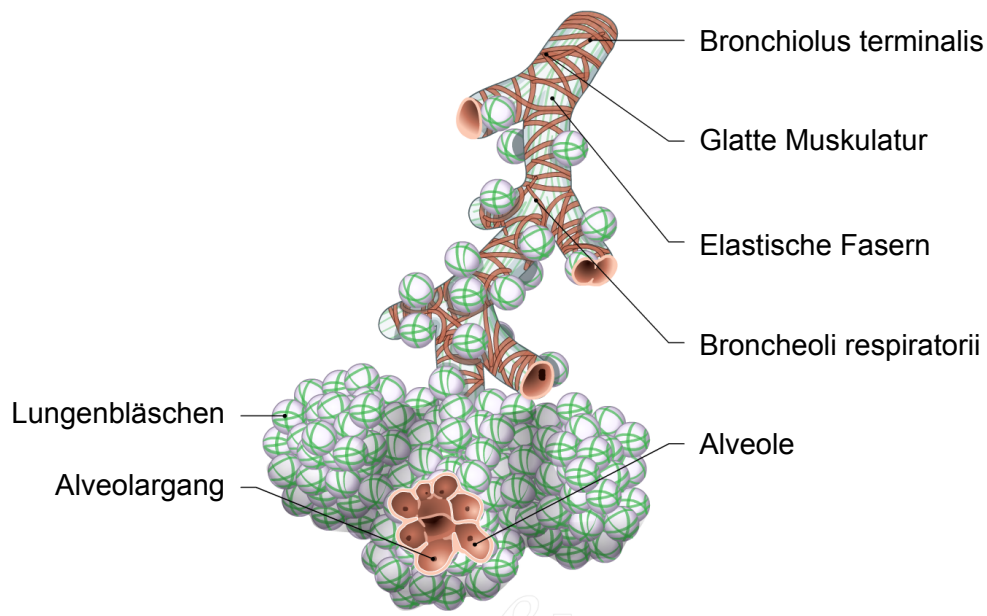
### 1.1 Anatomie der Lunge

Das Atmungssystem der Säugetiere wird unterteilt in den oberen und unteren respiratorischen Trakt. Bestandteile des oberen Abschnitts des Atmungssystems sind Mund, Nasenhöhle, Rachenraum, Kehlkopf sowie die Luftröhre. Der untere respiratorische Trakt gliedert sich in Bronchien und gasaustauschende Oberflächen (Moyes and Schulte 2008). Die eigentliche Lunge der Säugetiere besteht aus zwei Lungenflügeln, die weiter unterteilt sind. Die linke Seite besteht aus zwei, die rechte Seite aus drei Lungenlappen (Lobi) (Moll and Moll 2006; Schiebler and Korf 2007).

Die Luft wird eingeatmet, indem Rippenmuskulatur und Zwerchfell koordiniert zusammenwirken. Durch die Dehnung des Brustkorbs entsteht ein Unterdruck, der durch das Einströmen der Luft ausgeglichen wird. Die Lungenflügel sind so im Brustraum (Thorax) eingebettet, dass sie frei beweglich sind (Clauss and Clauss 2007). Die Lungenoberfläche ist mit der Tunica serosa überzogen. Sie wird in der Brusthöhle auch als Pleura bezeichnet. Zwischen Lungenoberfläche und Pleura herrscht Unterdruck, ohne ihn ist eine effektive Atmung nicht möglich.

Bei Zusammenbruch dieses Unterdrucks kollabiert die Lunge und es kommt zum sogenannten Pneumothorax (Clauss and Clauss 2007).

Das Gewebe der Lungen kann grob in den luftzuführenden und den Bereich des eigentlichen Gasaustauschs unterteilt werden. Die Bronchien enden in den Lungenbläschen oder Alveolen, welche den Bereich des Gasaustauschs bilden. Das Bronchialsystem umfasst



**Abbildung 1.1.1:** Feinstruktur der humanen Lunge; verändert nach: e-Anatomy, Micheau A, Hoa D, [www.imaios.com](http://www.imaios.com); 15. Juni 2013

sämtliche Bestandteile des luftleitenden Systems (Randall et al. 2000).

Von innen nach außen besteht der Aufbau aus verschiedenen Schichten. Das Epithel besteht im oberen Respirationstrakt aus mehrreihigem, hochprismatischem Flimmerepithel. In den Bronchiolen überwiegt einschichtiges Flimmerepithel (Moll and Moll 2006). Die darunter liegende Lamina propria besteht aus glatter Muskulatur. Weiterhin ist sie von einer Vielzahl elastischer Fasern durchzogen und enthält muköse sowie seröse Drüsen. Ihre Ausgänge öffnen in den Bronchus überziehen die Schleimhautoberfläche mit einem Schutzfilm (Moll and Moll 2006). Die äußerste Schicht der großen Bronchien bildet hyaliner Knorpel. Dort, wo sich der Durchmesser der Bronchien verringert, vermindert sich auch der Knorpelanteil. In den feinsten Verästelungen sind nur noch kleine inselförmige Ansammlungen zu finden (Zusammenfassung Lungenanatomie in Moll and Moll 2006).

In den Lungenbläschen findet der Gasaustausch statt. Die sogenannten Alveolen gehen von den Alveolargängen (Ductus alveolares) ab und sind becherartig geformt (Moll and Moll 2006). Beim Erwachsenen gibt es sie in einer geschätzten Anzahl von 300 Millionen, dabei bilden die effektive respiratorische Fläche, welche beim Menschen 80 bis 150 m<sup>2</sup>, bei der Maus ungefähr 1000 cm<sup>2</sup> groß ist (Daniels et al. 1989).

Die Alveolen bestehen aus verschiedenen Zelltypen. Dazu gehören die Pneumozyten Typ I, aus welchen sich das alveoläre Epithel aufbaut, sowie die größeren Surfactant-produzierenden Pneumozyten Typ II (Fuchs et al. 2003). Surfactant vermindert die Oberflächenspannung und bewahrt die Lungenbläschen vor dem Kollabieren, dient also als Antiatelektasiefaktor (Clauss and Clauss 2007). Eingeatmete Luft und zirkulierendes Blut sind in der Lunge durch eine dreischichtige Trennwand, die Blut-Luft-Schranke, voneinander getrennt. Sie besteht, von der Alveole aus gesehen, aus dem Surfactant-Film, einem



dünnen Fortsatz der jeweiligen Alveolarepithel-Zelle, den verschmolzenen Basalmembranen von Alveolarzelle und Endothelzelle sowie schließlich der Endothelzelle selbst (Moll and Moll 2006; Schiebler and Korf 2007). Die Diffusionsstrecke der Atemgase ist mit ca. 0,5 µm an dieser Stelle extrem gering (Moll and Moll 2006; Schiebler and Korf 2007).

## 1.2 Pneumonie

Die Pneumonie (Lungenentzündung) bezeichnet eine Inflammation des Alveolarraums der Lunge, die durch Krankheitserreger verursacht wird. In manchen Fällen ist auch das Interstitium betroffen. Insgesamt wird eine Einteilung in Lobärpneumonien, Bronchopneumonien und interstitielle Pneumonien vorgenommen. Unterscheidungsmerkmal ist hier der Grad und das Muster der Ausbreitung im Lungenparenchym. Ein anderes Einteilungskriterium berücksichtigt die Quelle der Ansteckung und unterscheidet ambulant erworbene sowie nosokomiale Pneumonien voneinander (Einteilung in Schaberg and Ewig 2001).

Hervorgerufen werden Pneumonien entweder durch virale, bakterielle oder Pilzinfektion der distalen Bereiche der Lunge. Die Erreger können durch verschiedenste Mechanismen dorthin gelangen, vor allem durch Inhalation. Jedoch auch Aspiration aus dem Pharynx (begünstigt durch Krankenhausbedingungen), hämatogene Aussaat und direkte Ausbreitung durch einen anderen Infektionsherd können Erreger in die Lunge einbringen.

Entscheidend für die Abwehr von pathogenen Keimen in der Lunge ist das Epithel, welches eine mechanische Barriere für Krankheitserreger darstellt. Darüber hinaus sind die Zellen in dieser Barriere wichtige Produzenten von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden während der Konfrontation mit Pathogenen (Bals and Hiemstra 2004).

Zu den charakteristischen Symptomen gehören Fieber, Schüttelfrost, Husten, eitriger Auswurf, Pleuraschmerz sowie erschwerte Atmung. Bei einigen Patienten zeigen sich auch Kopfschmerzen, Myalgien, Übelkeit, Diarrhoe und Unterleibsschmerzen. In Fällen schwerer Lungenentzündungen kann es im Verlauf zu einem Versagen des Herzkreislaufsystems kommen. Auch Bewusstseinsstörungen können auftreten (Lehnert and Werdan 2006).

Deutliche Unterschiede im Verlauf der Pneumonie und der Schwere der klinischen Symptome ergeben sich vor allem durch das Lebensalter und Gesundheitszustand der Patienten (Schaberg and Ewig 2001).

Bei älteren Menschen führen chronische Vorerkrankungen, Schluckstörungen, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), schlechterer Allgemein- sowie Ernährungszustand, Diabetes mellitus, chronische Nieren- und Herzinsuffizienz, individuell auch Rauchen und Alkohol zu einer höheren Anfälligkeit und höherer Sterblichkeit (Fung and Monteagudo-Chu 2010; Meyer 2010).

Dazu kommt, dass das Immunsystem im höheren Lebensalter weniger leistungsfähig ist und mechanische Integrität der Epithelien sich verschlechtert (Meyer 2010).

Weitere Risikogruppen sind Neugeborene, deren Immunsystem noch nicht voll ausgereift ist. Schätzungsweise 10% der globalen Kindersterblichkeit sind auf Todesfälle durch Lungenentzündung zurückzuführen (Nissen 2007).

Ebenfalls besonders gefährdet sind immunsupprimierte Personen, deren körpereigene Abwehr z.B. durch HIV-Infektionen (Rosen 2008), Immunsuppressionstherapie im Zuge von Transplantation oder Chemotherapien beeinträchtigt ist (Speert 2006; White 1995).

Der Verlauf einer Pneumonie wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, vor allem der körpereigenen Immunantwort. Dazu gehört die Granulozytenmigration aus den Blutgefäßen und deren Sekretion von histiotoxischen Substanzen. Diese Reaktion der Granulozyten bestimmt im Wesentlichen den Grad der Gewebeerstörung. Darüber hinaus ist die Monozytenmigration aus den Blutgefäßen zu nennen. Die Reifung zu Makrophagen am Infektionsort ermöglicht den Abbau extravaskulärer Flüssigkeit, Trümmer abgestorbener Zellen und Bakterien werden nur so effektiv beseitigt. Das „Aufräumen“ des Infektionsortes beeinflusst die Ausheilung der Entzündung entscheidend (Standiford et al. 1996).

Generell kann eine akute Entzündung in eine chronische Verlaufsform übergehen. Möglich sind aber auch eine Abszedierung, Vernarbung des Gewebes oder im günstigsten Fall eine vollständige Rückbildung der Pneumonie. Komplikationen bei Lungenentzündungen sind häufig Abszesse (z.B. durch *Staphylococcus aureus*) oder die Ausbildung eines Empyem (Lehnert and Werdan 2006).

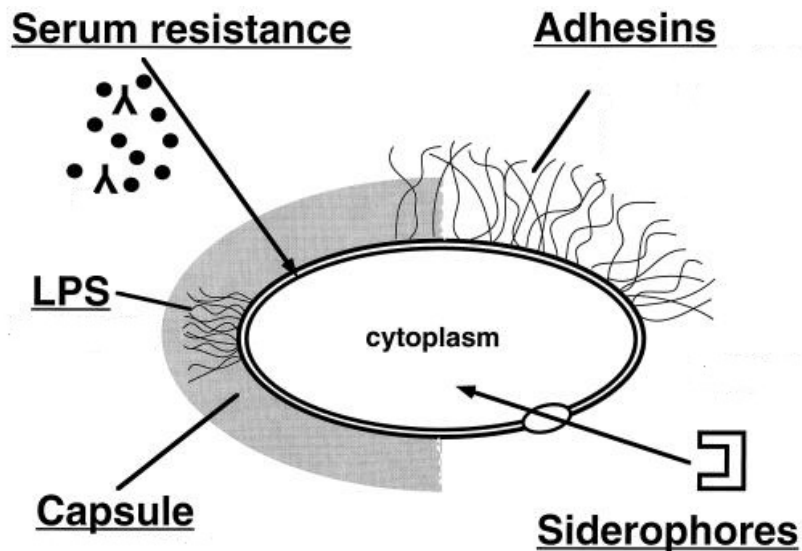
### 1.3 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* wurde 1882 von Friedländer aus Lungengewebe eines an Lungenentzündung verstorbenen Patienten isoliert (Köhler and Mochmann 1987). Aus diesem Grund wird die Entzündung der Lunge durch eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* auch „Friedländer-Pneumonie“ bezeichnet. Trevisan (1885) gab der Gattung ihren Namen „Klebsiella“, um den deutschen Mikrobiologen Edwin Klebs damit zu ehren.

Die Gattung *Klebsiella* umfasst insgesamt nur wenige pathogene Keime. Normalerweise findet man die Spezies überall in der Umwelt. Sie besiedelt Böden, Pflanzenteile, Abwasser sowie Gewässer wie Seen und Teiche (Bagley et al. 1978; Brown and Seidler 1973; Podschun et al. 2001; Seidler et al. 1975). Darüber hinaus kann man sie als Besiedler der Schleimhäute verschiedener Säugetiere nachweisen (Podschun and Ullmann 1998).

Unter den wenigen pathogenen Spezies ist *Klebsiella pneumonia* hervorzuheben.

Als einziges Bakterium in der Familie der Enterobacteriaceae produziert es erhebliche Mengen von Kapselpolysacchariden. Diese stellen den wichtigsten Pathogenitätsfaktor von *Klebsiella pneumonia* dar, die Kapsel schützt die Zellen sehr effektiv vor Phagocytose (Kabha et al. 1995), vor der Wirkung der Faktoren des Komplementsystems (Alvarez



**Abbildung 1.3.1:** Pathogenitätsfaktoren von *Klebsiella pneumoniae*; verändert nach Podschun and Ullmann 1998

et al. 2000), sowie antimikrobiellen Peptiden des Wirtsorganismus (Campos et al. 2004). Die Bakterien bilden durch die Kapsel schmierige Filme und zeigen diese Morphologie auch bei Anzucht auf Nährböden. Weitere Faktoren, die *Klebsiella pneumoniae* die erfolgreiche Besiedlung von Wirtsgeweben ermöglichen sind das Lipopolysaccharid (LPS) sowie Adhäsine, mit denen das Bakterium eine effektive Anhaftung an epitheliale Oberflächen erreicht.

*Klebsiella pneumoniae* besitzt darüber hinaus Siderophore (griechisch für „Eisenträger“), die in das umgebende Medium ausgeschieden werden und dort Eisen komplexieren. Die beladenen Siderophore können durch spezifische Transportsysteme wieder in das Bakterium aufgenommen werden. Über Siderophore kann *Klebsiella pneumoniae* sich mit dem ansonsten im Wirt stark limitierten Eisen versorgen, das es für sein Wachstum braucht (Podschun and Ullmann 1998). Unter optimalen Bedingungen ist *Klebsiella* ein sich rasch ausbreitender Keim (Kühn et al. 1993).

#### 1.4 Klebsiellen als Erreger nosokomialer Infektionen

Nosokomiale Infektionen haben vor allem durch das massive Aufkommen von Antibiotikaresistenzen in pathogenen Keimen neue Bedeutung erlangen können. Häufigere invasiver Eingriffe sowie steigende Zahlen an älteren und immunsupprimierten Patienten tragen dazu bei.

Als nosokomial werden Pneumonien bezeichnet, wenn sie im Krankenhausbereich erworben wurden, und frühestens 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme auftreten (Definition in Schaberg and Ewig 2001). Man unterscheidet darüber hinaus noch zwischen exogenen und endogenen Krankenhausinfektionen. Exogene Infektionen haben ihre Quelle in

der Umwelt des Patienten, dazu gehören das Pflegepersonal oder kontaminierte Gegenstände. Häufiger sind endogene Infektionen, verursacht durch die patienteneigene Flora (Schaberg and Ewig 2001). Lungenentzündungen, mit denen der Patient im Arbeitsumfeld oder im privaten Lebensbereich infiziert wurde, werden als ambulant erworben definiert (Höffken et al. 2005).

Im Krankenhausumfeld können gesundes Personal sowie Utensilien Überträger für opportunistische Keime werden, da in dieser Umgebung durch viele erkrankte Menschen eine höhere Dichte an Keimen auftritt. Folglich werden viel höhere Kolonisationsraten mit *Klebsiella pneumoniae* erreicht als im alltäglichen Umfeld außerhalb der Klinik.

Eine transiente Besiedlung der Schleimhäute sowie Gastrointestinaltraktes ist verbreitet, die Trägerraten bei Gesunden variieren je nach Studie 5% bis 38% im Stuhl sowie 1% bis 6% im Nasopharynx (Podschun and Ullmann 1998). Im Krankenhausumfeld ließ sich bei 77% der Untersuchten im Stuhl, bei 19% im Rachen und bei 42% auf den Händen der Patienten Besiedlung mit *Klebsiella pneumoniae* feststellen (Podschun and Ullmann 1998). Hierbei lässt sich eine positive Korrelation zwischen der Kolonisationsrate mit der Länge des Klinikaufenthaltes feststellen. Auch bei Klinikpersonal wurden erhöhte Trägerraten im Vergleich zu anderen Berufsgruppen festgestellt (Podschun and Ullmann 1998).

*Klebsiella pneumoniae* kann verschiedene nosokomiale Infektionen auslösen. Insgesamt am häufigsten sind Harnwegsinfektionen, auf Intensivstationen steht dagegen die *Klebsiella*-Pneumonie an erster Stelle, gefolgt von Harnwegsinfektionen und Sepsen (Panknin HT 2001).

Infection	By <i>Klebsiella</i> <sup>1</sup>	Rank <sup>2</sup>
UTI	6–17	5–7
Pneumonia	7–14	2–4
Septicemia	4–15	3–8
Wound infections	2–4	6–11
Nosocomial infections in intensive care unit patients	4–17	4–9
Neonatal septicemia	3–20	2–8

<sup>1</sup> % of infections caused by *Klebsiella*

<sup>2</sup> Ranking of *Klebsiella* compared to all other bacterial pathogens.

**Tabelle 1.4.1:** Anteil von Pneumonien von durch *Klebsiella* bedingten nosokomialen Infektionen; verändert nach Podschun and Ullmann 1998

*Klebsiella pneumoniae* - Infektionen können mit Antibiotika bekämpft werden, diese Bakterien sind aber aufgrund von Beta-Laktamasen zunehmend häufig resistent gegen Penicillin und Ampicillin. Darüber bildet *Klebsiella pneumoniae* häufig ESBL (ESBL = Extended-spectrum Beta-Laktamase). Das macht den Keim multiresistent gegen

viele Breitband-Antibiotika und verstärkt sein pathogenes Potential (Sahly et al. 2008). Die medikamentöse Therapie von *Klebsiella pneumoniae* - Infektionen wird zunehmend schwieriger. Im Augenblick wird zur Behandlung meist eine Kombinationstherapie mit Präparaten verschiedener Wirkstoffklassen benutzt, wobei Carbapenem-resistente *Klebsiella pneumoniae* Stämme zurzeit das größte Problem darstellen (Petrosillo et al. 2013). Alternative Behandlungsansätze ohne den Einsatz von Antibiotika werden ebenfalls getestet (Warnke et al. 2012).

## 1.5 Mausmodell der Pneumonie

Um den klinischen Verlauf und die Charakteristika der unterschiedlichen Pneumonien zu untersuchen, werden unter anderem Tiermodelle genutzt. Besonders häufig werden Mäuse benutzt, die wegen der kostengünstigen Haltung, der einfachen Vermehrung sowie der Möglichkeit zur Nutzung von *Inbred-Strains* oft in Experimenten Verwendung finden (Mizgerd and Skerrett 2008). Darüber hinaus gibt es viele genveränderte Mauslinien, die für die verschiedensten Fragestellungen zum Einsatz kommen können – *loss-of-function*, *gain-of-function*, Verknüpfungen mit Reportergenen oder die Expression der Phänotypen nur im gewünschten Gewebe sind möglich. Für die Induktion einer murinen Pneumonie kommen im Allgemeinen unterschiedliche Infektionsstrategien in Frage. Welches Vorgehen gewählt wird, hängt von Faktoren wie dem verwendeten Pathogen und den gemessenen Parametern der Studie oder des Experimentes ab (Übersicht in Mizgerd and Skerrett 2008; zusammengefasst in Tabelle 1.5.1).

Eine sehr realitätsnahe Art der Infektion erreicht der Experimentator, wenn er das gesunde Tier mit einem bereits infizierten Tier zusammensetzt und damit eine Ansteckung erreicht. Es gibt jedoch keine Möglichkeit, initiale Infektionsdosis und Zeitpunkt der Infektion festzustellen.

Die Applikation des Pathogens als Aerosol, dem die Versuchstiere kontrolliert ausgesetzt werden, ist eine andere Möglichkeit zur Generierung der murinen Pneumonie. Hierbei werden Kammern eingesetzt, in denen die Tiere nur über die Nase oder auch mit dem ganzen Körper mit dem Aerosol in Kontakt kommen. Über die Einstellung der Pathogenkonzentration kombiniert mit der Zeit, die das Tier begast wird, lässt sich ein einheitliches Inokulum erreichen.

Intubation sowie intratracheale Applikation einer Bakterienlösung stellen die direkte Möglichkeit zur Infektion eines Versuchstieres dar. Die beiden Methoden unterscheiden sich im Wesentlichen darin, dass für die intratracheale Applikation ein chirurgischer Eingriff nötig ist. Mögliche Fehlerquellen für den Versuch sind Reaktionen auf die Operation sowie unabsichtlich in die Verletzung eingeschleppte Fremd-Keime. Die Intubation dagegen ist schonender für das Tier und schließt solche unerwünschten Nebeneffekte aus.

Intranasale Applikation schließlich ist eine gängige Methode für die Untersuchung vie-

ler respiratorischer Pathogene. Die Methode ist leicht zu erlernen und besonders von Interesse, wenn die Infektion des oberen und unteren Respirationstraktes untersucht werden soll. Für manche Experimente kann es allerdings von Nachteil sein, dass der Erreger nicht so tief in den Respirationstrakt gelangt. In mehreren Studien wurden außerdem starke Schwankungen der pulmonaler Pathogenbelastung zwischen Tieren einer Versuchsgruppe beobachtet (Davis et al. 1986; DeMaria and Kapral 1978).

Zur Beurteilung solcher Infektionsversuche können unterschiedliche Parameter von Interesse sein. Die Bestimmung der bakteriellen Belastung (bacterial burden) der Versuchstiere kann durch Aufarbeitung des Lungengewebes und anschließende Zählung der Keime erfolgen. Für die quantitative Auswertung können verschiedenste Methoden zum Einsatz kommen wie das Ausplattieren des bearbeiteten Gewebes, PCR (Polymerase chain reaction) oder Biolumineszenz (Mizgerd and Skerrett 2008).

Zur weiteren Charakterisierung der Pneumonie kann außerdem der Einstrom von Neutrophilen aus dem Blut in das infizierte Lungengewebe bestimmt werden. Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) spült die im Luftraum vorhandenen Neutrophilen aus, die anschließend quantifiziert werden können. Durchflusszytometrie oder morphometrische Analysen sind hierbei häufig verwendete Methoden.

Die Bildung von Flüssigkeitsansammlungen durch den Entzündungsprozess ist ein weiterer, häufig genutzter Parameter für die klinische Einschätzung der Pneumonie im Mausmodell (Mizgerd and Skerrett 2008). Die genaue Messung der Größe und Ausbreitung dieser Ödeme ist jedoch weiterhin schwierig. Es gibt zahlreiche methodische Möglichkeiten (Parker and Townsley 2004), häufig wird jedoch das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht der Lunge bestimmt, obwohl es meist große Schwankungen in den erhaltenen Werten gibt. Große Parallelen zwischen Maus und Mensch gibt es bei der Entwicklung der Sauerstoffsättigung bei Fortschreiten der Lungenentzündung. Schwere Erkrankungen führen zu arterieller Hypoxämie und einem verringerten alveolär-arteriellem Sauerstoffgradient. Die Sauerstoffsättigung des Blutes kann bei Mäusen methodisch ähnlich wie bei menschlichen Patienten bestimmt werden. Während der fortschreitenden Lungenentzündung erhöht sich im Mensch (Ratjen et al. 1999) und auch in der Maus die Durchlässigkeit der Kapillaren und damit die Konzentration von Serumproteinen, die aus dem Blut übertreten.

	Vorteile	Nachteile
Aerosol Exposition	„Natürliche“ Übertragung Simultane Infektion mehrerer Tiere Gleichmäßige, vergleichbare Übertragung Symmetrische bilaterale Infektion in der Lunge Keine Anästhesie erforderlich	Aerosol Management System ist teuer Aerosol kann in Augen und Fell gelangen Tiere müssen evtl. fixiert werden Manche Pathogene als Aerosol nicht überlebensfähig
Intratracheale Injektion	Modell für oropharyngiale Aspiration Präzise Dosierung in den tieferen Respirationstrakt Einfache zu erlernende und durchzuführende Prozedur Einseitige Applikation möglich	Anästhesie erforderlich Chirurgischer Eingriff erforderlich Unsymmetrische Infektion der Lunge möglich Versetzte Startzeit des Experiments bei Verwendung mehrerer Tiere
Perorale Intubation	Modell für oropharyngiale Aspiration Präzise Dosierung in den tieferen Respirationstrakt Einseitige Applikation möglich Keine Operationswunde	Anästhesie erforderlich Technisch anspruchsvoll Unsymmetrische Infektion der Lunge möglich Versetzte Startzeit des Experiments bei Verwendung mehrerer Tiere Kontamination mit oraler Flora möglich
Intranasale Inokulation	Modell für oropharyngiale Aspiration Infektion des oberen und unteren Respirationstrakts Einfache Prozedur	Anästhesie erforderlich Stark variierende örtliche Infektion der Lunge Unsymmetrische Infektion der Lunge möglich Kontamination mit oraler Flora möglich

**Tabelle 1.5.1:** Übersicht und Vergleich gängiger Infektionsmethoden für Modelle muriner Atemwegsinfektionen; nach Mizgerd and Skerrett 2008

Diese Erhöhung von Protein kann gemessen werden. Häufig wird repräsentativ für andere Proteine der Spiegel an Serumalbumin bestimmt.

Zu den bisher genannten Parametern kommen noch visuelle Untersuchungen, die ohnehin in regelmäßigen Abständen am Versuchstier vorgenommen werden müssen. Dabei werden der Zustand des Fells, die Körperhaltung und die Aktivität des Tieres eingeschätzt. Körperöffnungen wie Nase oder Augen werden auf Ausfluss untersucht.

Obwohl die Maus als Modellorganismus viele Möglichkeiten bietet, kann man Ergebnisse aus Mausexperimenten nicht uneingeschränkt auf den Menschen anwenden. Die Relevanz der Ergebnisse muss von Experiment zu Experiment geprüft werden, da es auch zahlreiche Unterschiede in Anatomie und Physiologie zwischen Maus und Mensch gibt. Darüber hinaus treten in der Maus auch immunologische Besonderheiten auf, die für die Planung und Auswertung von Experimenten berücksichtigt werden müssen (Übersicht in Mizgerd and Skerrett 2008).

## 1.6 Immunabwehr der Lunge

### 1.6.1 Mechanische Abwehr

Durch Pathogene ausgelöste Lungenentzündungen werden vom Immunsystem bekämpft. Im Fall einer Pneumonie sind gerade die Gewebsschäden, die durch die starke Reaktion des Immunsystems hervorgerufen werden, kritisch für die Auflösung der Infektion und die Erholung des Organismus (Kumar and Chhibber 2011). Körperoberflächen, die mit der Außenwelt in Kontakt kommen, werden in besonders hohem Maße mit pathogenen Keimen konfrontiert. Aus diesem Grund besitzt jedes dieser Epithelien spezielle Schutzmaßnahmen, die ein Eindringen von Krankheitserregern verhindern soll.

Die Lunge besitzt anatomischen, mechanischen und biochemische Schutzmechanismen, um sich vor Infektionen zu schützen. Dazu gehört zum Beispiel der Hustenreflex, der den Respirationstrakt von Keimen und Fremdkörpern befreien soll. Nach überwundenen Infektionen dient er dazu, abgetötete Pathogene und zu Grunde gegangene Immunzellen zu entfernen (Zhang et al. 2000). Der Glottisschluss sowie die mukoziliäre Aktivität des bronchialen Epithels sind ebenfalls Maßnahmen, die einer Besiedlung durch Krankheitserreger vorbeugen können. Darüber hinaus sind die Luftröhre sowie die Bronchien mit einem Feuchtfilm überzogen, der mucusreich und damit viskos ist. Hier werden größere Partikel wie etwa Staub effektiv abgefangen. Durch die Bewegung der Flimmerhärchen des Epithels werden sie direkt abtransportiert. Kleinere Teilchen wie etwa Bakterien, welche in den Alveolarraum gelangen, können dort durch die zweite Verteidigungslinie der Alveolarmakrophagen sowie löslicher mikrobizider Moleküle zerstört werden. (Überblick in Zhang et al. 2000).



### 1.6.2 Alveolarmakrophagen und Granulozyten

Alveolarmakrophagen sind die vorrangigen Abwehrzellen des Alveolarraums und besitzen wichtige phagozytische und sekretorische Funktionen (Delclaux and Azoulay 2003). Sie exprimieren die Markermoleküle F4/80 (Lin et al. 2010) sowie SiglecF (Tateno et al. 2007) und spielen eine Schlüsselrolle in der Immunantwort der Lunge, denn sie reagieren im Fall einer Infektion sofort und phagozytieren bakterielle Krankheitserreger (Delclaux and Azoulay 2003). Sie produzieren außerdem Interleukin-8, welches die neutrophilen Granulozyten zum Infektionsort lockt (Delclaux and Azoulay 2003) sowie TNF-alpha und Interleukin-1b. Damit stellen die Makrophagen zu Beginn die Weichen für den weiteren Verlauf der Infektion (Broug-Holub et al. 1997; Herold et al. 2011). Sie werden zusätzlich durch zahlreiche andere Zellen des Immunsystems unterstützt. Sie sind auch in der Lage, Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und gehören somit zu den sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Alveolarmakrophagen können außer Zytokinen auch andere Mediatoren (Komplementfaktoren, Leukotrien B4) freisetzen, mit denen sie in erster Instanz Granulozyten aus dem Blut in den Alveolarraum rekrutieren (Rink et al. 2011).

Neutrophile sind die häufigsten Leukozyten (Anteil von 50-65% im Menschen). Sie entstehen im Knochenmark und weisen im unausgereiften Zustand einen stabförmigen Kern auf, weshalb sie als Stabkernige bezeichnet werden. Ausgereifte Neutrophile dagegen weisen drei bis fünf Kernsegmente auf (Schiebler and Korf 2007). Neutrophile sind kurzlebig und sterben durch Apoptose, wenn sie nicht innerhalb weniger Tage in Kontakt mit Infektionen kommen (Rink et al. 2011). Werden sie jedoch durch chemotaktische Signale angelockt und erreichen sie die Region der Entzündung, binden sie mit Hilfe des L-Selektins auf ihrer Oberfläche an die Epithelzellen der örtlichen Kapillaren (Janeway and Murphy 2009). Schließlich kann sich der Granulozyt zwischen den Epithelzellen hindurch bewegen und an den Infektionsort gelangen. Die Rekrutierung Neutrophiler und ihre Reaktionen am Infektionsort sind ebenso zentral in der frühen Phase der Abwehr respiratorischer Infektionen (Schultz and van der Poll 2002; Wang et al. 2001), auch in immunsupprimierten Tieren (Wang et al. 2001). Die eingewanderten Neutrophilen werden am Infektionsort aktiviert, beginnen ebenfalls zu phagozytieren und töten Pathogene ab (Balamayooran et al. 2010). Die von ihnen aufgenommenen Mikroorganismen werden durch die Inhalte der Granula der Neutrophilen abgetötet, die Superoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale, hypochlorige Säure, antimikrobielle kationische Proteine und Lysozym enthalten können (Delclaux and Azoulay 2003). Sie produzieren ebenfalls Zytokine, um weitere Immunzellen zum Infektionsort zu dirigieren (Schultz and van der Poll 2002; Wang et al. 2001). Das inflammatorische Geschehen wird dabei durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  weiter verstärkt. Neutrophile gehören damit zu den wichtigsten Immunzellen in der Verteidigung gegen bakterielle In-

fektionen. Selektive Depletion führt zu signifikanter Reduktion der Clearance vieler pathogener Mikroorganismen, darunter auch *Klebsiella pneumoniae* (Garvy and Harmsen 1996; Jeyaseelan et al. 2006; Tateda et al. 2001). Durchflusszytometrisch kann man neutrophile Granulozyten durch ihre starke Expression von GR-1 und CD11b charakterisieren (Cooper et al. 1993).

### 1.6.3 Dendritische Zellen

Für die Antwort auf Infektionen sind neben den zuvor genannten Zelltypen die Dendritischen Zellen (DC) besonders wichtig. Sie stellen die bedeutendste Gruppe professioneller antigenpräsentierender Zellen dar und bilden die Verbindung zwischen innatem und adaptivem Immunsystem (Martin and Resch 2009; Rink et al. 2011).

DC entwickeln sich im Knochenmark und werden als unreife Vorläufer ins Blut entlassen. Im Falle eines Infektes wandern sie ins entzündete Gewebe ein, angelockt durch chemotaktische Signale, die vor allem von Makrophagen freigesetzt werden. Sie beginnen dort große Mengen Antigene über Phagozytose aufzunehmen. Ihre Hauptfunktion liegt jedoch nicht in der Eliminierung der eingedrungenen Pathogene, die DC unterscheiden bei der Aufnahme von Material nicht zwischen körpereigenem und fremdem Material. Sie prozessieren jedoch aktiv die aufgenommenen Antigene. Dafür wird Material aus der Umgebung durch DC phagozytiert und kleine Stücke mit den MHC(= Major histocompatibility complex)II Molekülen gekoppelt auf die Zelloberfläche geschleust. Ihre Phagozytoseaktivität nimmt über den Verlauf des Prozesses kontinuierlich ab (Martin and Resch 2009; Rink et al. 2011). Hat die DC ihre Oberfläche möglichst dicht mit MHCII-Antigen-Komplexen beladen, können CD4 positive T-Zellen diese Komplexe auf Bindung an ihren spezifischen T-Zellrezeptor überprüfen.

Die im Gewebe aktivierten DC verändern also während dieses Reifungsprozesses ihren Phänotyp, ihr Verhalten und ihre Funktion. Gleichzeitig wird die Produktion von costimulatorischen Molekülen (vor allem CD80 und CD86) gesteigert, mit deren Hilfe sie später andere Immunzellen aktivieren können. Diese Moleküle wandern ebenfalls auf die Oberfläche der Zelle. Darüber hinaus werden nun auch andere Chemokin-Rezeptoren exprimiert, so dass die sich entwickelten DC für andere Signalstoffe sensitiv werden. Im Zuge ihrer Reifung wandert die DC schließlich aus und folgt dem chemotaktischen Gradienten, um den nächstgelegenen Lymphknoten zu erreichen. Hier wandert sie in die T-Zell Zone ein und ist voll ausgereift in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren (Überblick in Martin and Resch 2009; Rink et al. 2011).

Der erste Vertreter dieser besonderen Immunzellen wurde 1868 in der Epidermis entdeckt und damals als Langerhans-Zelle bezeichnet. Der erste Nachweis in der Maus erfolgte erst später in der Milz (Steinman and Cohn 1973). Die Morphologie der DC ist gekennzeichnet durch ihre langen, astartigen Ausläufer (griechisch: dendros = Baum).

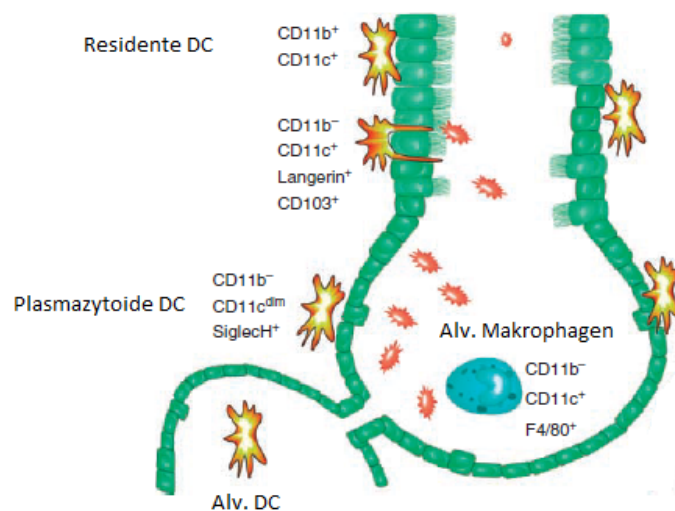
Seit der Entdeckung der Langerhans-Zellen ist sehr viel Zeit vergangen. Inzwischen

werden DC nicht mehr als homogene Gruppe betrachtet. Sowohl im humanen als auch im murinen System sind inzwischen zahlreiche Subpopulationen charakterisiert und ihre Funktion untersucht worden (Villadangos and Heath 2005). Darüber hinaus werden spezifisch für das jeweilige Gewebe Die Benennung dieser ‚Subsets‘ ist bisher noch nicht einheitlich gestaltet.

## 1.7 Pulmonale Subpopulationen Dendritischer Zellen

Wenn Lehrbücher diese Vielfalt an DC-Subpopulationen berücksichtigen, unterscheiden sie meist zwischen myeloiden und plasmazytoiden DC, gemäß ihres postulierten Ursprungs aus der myeloiden oder lymphatischen Reihe (Rink et al. 2011).

Andere Autoren (GeurtsvanKessel and Lambrecht 2008; McGill et al. 2008) bezeichnen die mDC dagegen als konventionelle DC (cDC). Eine Unterscheidung nach dem Kriterium der myeloiden oder lymphoiden Reihe wird nicht explizit vorgenommen.



**Abbildung 1.7.1:** Übersicht der pulmonalen DC Subsets und Makrophagen sowie ihrer wichtigsten Oberflächenmarker; verändert nach GeurtsvanKessel et al., 2008

Nach der letzteren Definition werden die DC der Lunge anhand der differentiellen Expression von Oberflächenmarkern weiter unterteilt. In anderen Publikationen werden die DC der Lunge auch gewebespezifisch als Gruppe der RDC (respiratorische DC) bezeichnet (Kim and Braciale 2009). Alle murinen DC exprimieren das Integrin CD11c, sie können positiv oder negativ für CD11b (Integrin $\alpha$ M Kette) sein (Wikstrom and Stumbles 2007). Darüber hinaus besitzt die Lunge DC, die ähnlich den Langerhans-Zellen der Haut eine Art Wächterfunktion wahrnehmen (Lambrecht et al. 1998). Diese exprimieren kein CD11b, tragen jedoch CD103 ( $\alpha$  E integrin) auf ihrer Oberfläche und sind Langerin (CD207) positiv (Sung et al. 2006).

Es wurde nachgewiesen, dass sie die Fähigkeit besitzen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen effektiv zu aktivieren und zu restimulieren (del Rio et al. 2007).

Im Interstitium der Lunge sind ebenfalls CD11b positive und negative cDC nachweisbar (Wikstrom and Stumbles 2007), der Alveolarraum enthält CD11c und CD11b doppelt positive cDC wie auch autofluoreszente Alveolarmakrophagen. (GeurtsvanKessel and Lambrecht 2008).

Funktionell unterscheiden sich die Subpopulationen deutlich voneinander, besonders die plasmazytoiden DC scheinen andere Aufgaben wahrzunehmen. Sie konnten durchflusszytometrisch leichter abgetrennt werden seit 2003 ein zusätzlicher spezifischer Marker entdeckt wurde (Asselin-Paturel et al. 2003). Der Antikörper richtet sich gegen das *Bone marrow stromal cell antigen 2*, man benannte ihn aber nach dem Klon 120G8. Inzwischen gibt es noch andere Marker, die spezifisch pDC markieren, darunter SiglecH (Blasius and Colonna 2006) sowie mPDCA1. Davor behalf man sich bei der Analyse mit Kombination von CD11c und CD11b mit dem Marker B220 (Björck 2001; Brawand et al. 2002), für den pDC positiv sind. Dieses Molekül ist allerdings nicht spezifisch für pDCs sondern auch auf B-Zellen exprimiert (Gerberick et al. 2002; Johnson et al. 1989).

Bei plasmazytoiden DC ist die Fähigkeit, Antigen aufzunehmen und zu prozessieren geringer als bei myeloiden DC ausgebildet. Dafür besitzen sie die Fähigkeit, sowohl im humanen als auch im murinen System nach Aktivierung große Mengen Interferon- $\alpha$  zu produzieren. Erwähnt wurden die Zellen bereits durch Trinchieri et al., 1978, wo über ihren Ursprung und ihrer Zuordnung zu den DC noch keine Klarheit bestand. Als pDC wurden sie erst 1999 von Siegal et al. in Science beschrieben.

Ausgeschüttetes Interferon- $\alpha$  aktiviert die umliegenden Zellen. Diese bilden daraufhin Proteine, welche einerseits eine weitere Virus-Synthese in befallenen Zellen hemmen und den Abbau von viraler RNA bewirken. Interferon- $\alpha$  führt außerdem dazu, dass von umliegenden Zellen vermehrt MHC-Klasse-I-Moleküle gebildet werden, sodass die Erkennung virusinfizierter Zellen durch T-Lymphozyten erleichtert wird. Darüber hinaus aktiviert es NK-Zellen, welche die Abwehr des Virus ebenfalls unterstützen (Janeway and Murphy 2009).

Mit ihrer starken Interferon- $\alpha$  Produktion sind pDC folglich hocheffektiv im Kampf gegen Virusinfektionen, obwohl sie eine sehr kleine Subpopulation darstellen. Im humanen und murinen System machen sie 0,2-0,8% der Blutzellen aus, produzieren jedoch ungefähr 95% des Interferon(IFN) alpha als Reaktion auf Virusinfektionen (Lande and Gilliet 2010; Liu 2005). Diese Zahlenverhältnisse verdeutlichen die funktionelle Bedeutung dieser DC-Subpopulation. Im normalen, nicht-entzündeten respiratorischen Trakt liegen die DC in Form eines Netzwerkes entlang des Epitheliums und der Mukosa der Luftwege vor. Es befinden sich ebenfalls DC im Lungenparenchym und vereinzelt in den Luftwegen (Lambrecht and Hammad 2012).

Einige Subpopulationen sind spezifisch in bestimmten anatomischen Bereichen der Lunge lokalisiert. In der Mukosa und den pulmonaren Gefäßen sind dies vor allem residente CD103 positive DC, die in der Lage sind größere Mengen IL12p40 herzustellen.

Subset	Beschriebene Funktion
CD103 DC	Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen; Kreuzpräsentation
pDC	Antivirale Immunität; IFN $\alpha$ Produktion
MoDC/CD11b <sup>hi</sup> DC	CD4 T-Zell Aktivierung

**Tabelle 1.7.1:** Übersicht ausgewählter pulmonaler DC-Subsets und ihrer bisher beschriebenen Funktionen

CD11b stark positive DC dagegen kommen bevorzugt in der Submukosa sowie dem Lungenparenchym vor. Sie werden als potente Produzenten von einer Reihe inflammatorischer Mediatoren dargestellt. pDC kommen ebenfalls, wenn auch in geringerer Zahl, im Lungenparenchym vor und stellen ein drittes Subset dar (Hao et al., 2008). Zusätzlich analysiert werden *Monocytic DC* (MoDC), welche aus für GR1 stark positiven Monozyten hervorgehen und bei Infektionen mit Influenza eine wichtige Rolle spielen. Aus diesen entwickeln sich auch Exsudatmakrophagen sowie eine Übergangsform zwischen ihnen und den MoDC (Lin et al., 2008).

Die Differenzierung von MoDC ist sehr schwierig und wird in Publikationen unterschiedlich vorgenommen. Kim et al. (Kim and Braciale 2009) schließen aus der Population der CD45/CD11c positiven DC die Alveolarmakrophagen sowie die pDC aus, um anschließend gemäß der Expression von CD11b und MHCII die MoDC (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup>) zu definieren.

Die Arbeitsgruppe um Lambrecht differenziert MoDC aus der Masse der CD11c/CD11b sowie MHCII positiven DC und verwendet die Marker Ly6C sowie MAR-1 und CD64 für die Diskriminierung (Plantinga et al. 2013).

## 1.8 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Heterogenität und Modulation der respiratorischen Zellpopulationen unter nichtinfektiösen Bedingungen in Inzucht-Mausstämmen sowie unter infektiösen Bedingungen während einer bakteriellen Pneumonie zu untersuchen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den respiratorischen Dendritischen Zellen. Dazu wird eine durchflusszytometrische Methode zur Analyse definierter leukozytärer Zellpopulationen angewendet, um diese quantitativ zu untersuchen und somit grundlegende Vergleichswerte für wissenschaftliche Untersuchungen zu liefern. Darüber hinaus soll auch die Fähigkeit zur Zytokinsynthese zwischen verschiedenen Inzucht-Mausstämmen dargestellt werden, die den genetischen Hintergrund vieler muriner Krankheitsmodelle bildet. Ein besonderer Schwerpunkt wird in dieser Untersuchung auf die respiratorischen DC-Populationen gelegt.

Weiterführend sollen im Modell der experimentellen Klebsiella-Pneumonie quantitative Veränderungen der respiratorischen DC-Subsets im Vergleich zum gesunden Tier betrachtet werden. Wichtige Charakteristiken dieser Subpopulationen werden dargestellt, einzelne funktionelle Unterschiede im Infektionsmodell sollen herausgearbeitet werden.

Darüber hinaus soll die Frage beantwortet werden, ob sich die spezifische Immunantwort auf *Klebsiella pneumoniae* durch eine Beeinflussung des TLR-Signalings modulieren lässt, was für therapeutische Zwecke in Zukunft von Bedeutung sein könnte.

Die Dendritischen Zellen werden allgemein als Bindeglied zwischen innater und adaptiver Immunität dargestellt. Möglicherweise haben einzelne Subpopulationen auf den Verlauf bakterieller Infektionen und die Immunreaktion einen wesentlich spezifischeren Einfluss als bisher vermutet.

# 2

## Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Zubehör

**Tabelle 2.1.1:** Verwendete Geräte und Zubehör

Geräte	Typ und Zubehör	Hersteller
MidiMACS™ Separator	Multistand/ Magnethalterung für Säulchen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
MultiStand AutoMACS	Separator + Appendix Software V1.12	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Brutschrank	HERAcell 240 CO <sub>2</sub> Inkubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
Durchfluss-zytometer	BD FACSCanto II + FACSDiva Software V6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, D
	BD FACS Aria III + FACSDiva Software V6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, D

Fortsetzung auf der nächsten Seite

**Tabelle 2.1.1 – Fortsetzung**

Geräte	Typ und Zubehör	Hersteller
ELISA Reader	TECAN Sunrise + Magellan Software V6.5	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
ELISA Washer	TECAN Hydroflex	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Kamera (Digital sight)	DS-1QM	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Mikroskope	Leitz	Biomed, Wetzlar, D
	Leica DM IRB	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
	Nikon-Eclipse (TE 2000-E) + NIS-Elements Software	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
NanoDrop	NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen, D
Elektr. Pipettierhilfe	PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald, D
Pipetten	2 µl - 1000 µl	Eppendorf, Wien, A
Sterilbank	Heraeus Klasse 2 TypH	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Vortex	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
Waagen	AE 100 S/9 und PJ 6000/9	METTLER-TOLEDO, Kirchheim, D
	Digitalwaage TP-500	DIPSE Digitalwaagen, Oldenburg, D
Wasserbad	ED Klasse I	Julabo Labortechnik, Seeibach, D
Zählkammer	Neubauer 0,0025 mm <sup>2</sup> / 0,1 mm	Brand GmbH, Schwerin, D
Zentrifugen	Mikro 20	Hettich, Tuttlingen, D
	Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen, D
	Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hanau, D



## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.1.2:** Verbrauchsmaterial

Material	Typ und Zubehör	Hersteller
Butterfly Kanülen	Dispomed Ecoflo, 21 G, Sicherheitsschlauch 30 cm	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, D
FACS-Röhrchen	5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falconröhrchen	15 und 50 ml (Polypropylen)	BD Labware, Le Pont De Claix, F
Glaspipetten	2 – 25 ml	Hirschmann, Eberstadt, D
Insulin-Kanülen	OMNISCAN Insulin-Kanülen 100 Insulin 0,5 ml/50 IU, 1 ml	Braun, Melsungen, D
Kanülen	BD Microlance TM 3 18G x ½ (1,20 mm x 40 mm) 20G x ½ (0,9 mm x 40 mm) 26G x ½ (0,45 mm x 13 mm)	BD, Heidelberg, D
MACS Separationsssäulchen	Large Cell Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Pasteur Pipetten	Pasteur Capillary pipettes 3 ml	BD Labware, Le Pont De claix, F
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpell	Feather Disposable Scalpel, Form 24	Dr. JUNGHANS Medical GmbH, Bad Lausick, D
Spritzen	1, 5, 10 und 20 ml	Braun, Melsungen, D
Sterile Tupfer	Pur-Zellin sterile Tupfer 4 x 5 cm	PAUL HARTMANN Ges.m.b.H., Wiener Neudorf, AU
Sterilfilter	0,22 µm 0,45 µm 0,8 µm 5 µm	Sartorius, Göttingen, D
Zellsiebe	40 und 70 µm (Nylon)	BD, Erembodegem, B

Fortsetzung auf der nächsten Seite

**Tabelle 2.1.2 – Fortsetzung**

Material	Typ und Zubehör	Hersteller
Zellkulturplatten, Zellkulturscha- len/ -flaschen	96-well Platte flatbottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
	96-well Platte roundbottom	
	Advanced TC Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm <sup>2</sup>	
	Advanced TC 100 mm Zellkulturschale	
	6-well PureCoat Platte Amin, flatbottom	BD Labware, Le Pont De Claix, F
	24-well PureCoat Platte Amin, flatbottom	
	PureCoat 100 mm Zellkulturschale Amin	
	75 cm <sup>2</sup> PureCoat Zellkulturflasche Amin mit Belüftung	
	Zellkulturschale 60 x 15 mm	Nunc GmbH, Invitrogen, Karlsruhe, D

### 2.1.3 Versuchstiere

**Tabelle 2.1.3: Versuchstiere**

Stamm	Zulieferer	Charakteristiken
C57BL/6NCrI	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D	Inzucht-Stamm
C3H/HeNCrI	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D	Blind durch Retinale Degeneration; Inzucht-Stamm
BALB/cAnNCrI	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D	Inzucht-Stamm
DBA/2NCrI	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D	Inzucht-Stamm
129S2/SvPasCrI	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D	Inzucht-Stamm

## 2.1.4 Antikörper

Für die Färbung der Zellen sowie die anschließenden FACS Analysen wurden mit folgenden Fluorochromen konjugierte Antikörper verwendet:

1. FITC                      Fluorescein-5-isothiocyanat
2. PE                        Phycoerythrin
3. PE-Cy7                Tandem-Konjugat aus Phycoerythrin und dem Cyanin-Farbstoff 7
4. PerCPCy5.5        Tandem-Konjugat aus Peridinin Chlorophyll Protein und dem Cyanin-Farbstoff 5.5
5. APC                     Allophycocyanin
6. APC-Cy7            Tandem-Konjugat aus Allophycocyanin und dem Cyanin-Farbstoff 7
7. PB                        Maleimid; Handelsbezeichnung Pacific Blue

**Tabelle 2.1.4:** Verwendete Fluorochrome und ihre Extinktions/Emmissionswerte

Fluorochrom	Extinktion (nm)	Emission (nm)
FITC	403	455
PE	480;565	578
PE-Cy7	480;565;743	767
PerCPCy5.5	490	695
APC	650	660
APC-Cy7	650;755	767
PB	403	455
Sytox Blue	431	480

**Tabelle 2.1.5:** Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in FITC

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
I-A <sup>b</sup>	AF6-120.1	0,5 mg/ml	116406	Biolegend, Uithoorn, NL
Fortsetzung auf der nächsten Seite				

**Tabelle 2.1.5 – Fortsetzung**

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
CD3e	145-2C11	0,5 mg/ml	553058	BD Pharmingen
CD19	6D5	0,5 mg/ml	115506	Biolegend, Uithoorn, NL
TCRbeta chain	H57-597	0,5 mg/ml	109206	Biolegend, Uithoorn, NL
TCR gd	GL3	0,5 mg/ml	118106	Biolegend, Uithoorn, NL
CD11b	M1/70	0,5 mg/ml	101206	Biolegend, Uithoorn, NL
CD4	GK 1.5	0,5 mg/ml	100406	Biolegend, Uithoorn, NL
CD8a	53–6.7	0,5 mg/ml	100706	Biolegend, Uithoorn, NL
CD45R/B220	RA3-6B2	0,5 mg/ml	103206	Biolegend, Uithoorn, NL
TER-119	TER-119	0,5 mg/ml	116206	Biolegend, Uithoorn, NL
CD11c	N418	0,5 mg/ml	117306	Biolegend, Uithoorn, NL
CD49b	DX5	0,5 mg/ml	108906	Biolegend, Uithoorn, NL
NK1.1	PK136	0,5 mg/ml	108706	Biolegend, Uithoorn, NL
CD8b	YTS156.7.7	0,5 mg/ml	126606	Biolegend, Uithoorn, NL
FceR1	MAR-1	0,5 mg/ml	134306	Biolegend, Uithoorn, NL

**Tabelle 2.1.6:** Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in PE

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
CD3e	145-2C11	0,2 mg/ml	100307	Biolegend, Uithoorn, NL
Ly-6G/Ly-6c	RB6-8C5	0,2 mg/ml	561084	BD Pharmingen
NK-1.1	Pk136	0,2 mg/ml	108708	Biolegend, Uithoorn, NL
Siglec-F	E50-2440	0,2 mg/ml	562068	BD Pharmingen

**Tabelle 2.1.7:** Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in PE-Cy7

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
CD11c	N418	0,5 mg/ml	117318	Biolegend, Uithoorn, NL
CD4	Gk1.5	0,2 mg/ml	100422	Biolegend, Uithoorn, NL
CD 90.2	53 – 2.1	0,2 mg/ml	140310	Biolegend, Uithoorn, NL
Arm. Hamster IgG, Isotype	HTK888	0,2 mg/ml	400921	Biolegend, Uithoorn, NL

**Tabelle 2.1.8:** Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in PerCPCy5.5

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
CD11b	M1/70	0,2 mg/ml	550993	BD Pharmingen
CD19	1D3	0,2 mg/ml	551001	BD Pharmingen
CD4	Gk 1.5	0,2 mg/ml	100434	BL, Uithoorn, NL
CD103	2E7	0,2 mg/ml	121416	BL, Uithoorn, NL
CD86	GL-1	0,2 mg/ml	105028	BL, Uithoorn, NL
SiglecH	551	0,2 mg/ml	129614	BL, Uithoorn, NL

**Tabelle 2.1.9:** Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in APC

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
CD8a	53-6.7	0,2 mg/ml	100712	BL, Uithoorn, NL
GR-1	RB6-8C5	0,2 mg/ml	108412	BL, Uithoorn, NL
CD40	3/23	0,2 mg/ml	124612	BL, Uithoorn, NL
CD86	GL-1	0,2 mg/ml	105012	BL, Uithoorn, NL
pDC/IPC-A647 (120G8)	120G8	0,2 mg/ml	DDX0390A647	Dendritics, Lyon, F

**Tabelle 2.1.10:** Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in APC-Cy7

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
CD45	30-F11	0,2 mg/ml	103116	BL, Uithoorn, NL
CD44	IM7	0,2 mg/ml	103028	BL, Uithoorn, NL

**Tabelle 2.1.11:** Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in Pacific Blue

Antikörper	Klon	Konzentration	Cat.no.	Hersteller
NK1.1	PK136	0,5 mg/ml	108722	BL, Uithoorn, NL
CD11b	M1/70	0,5 mg/ml	101224	BL, Uithoorn, NL
F4/80	BM8	0,5 mg/ml	123124	BL, Uithoorn, NL
I-A <sup>b</sup>	AF6-120.1	0,2 mg/ml	116422	BL, Uithoorn, NL
CD25	eBio3C7	0,2 mg/ml	48-0253-82	Ebioscience, Frankfurt, D
CD44	IM7	0,5 mg/ml	103020	BL, Uithoorn, NL

### 2.1.5 Beads

**Tabelle 2.1.12:** Compensation Beads (FACS-Kompensation)

Beads	Cat.no	Hersteller
Anti-Mouse Ig, $\kappa$ Neg. Control Compensation Particles Set	552843	BD Pharmingen <sup>TM</sup> , Heidelberg, D
Anti-Rat and Anti-Hamster Ig, $\kappa$ Neg. Control Compensation Particles Set	552845	BD Pharmingen <sup>TM</sup> , Heidelberg, D

### 2.1.6 Chemikalien

**Tabelle 2.1.13:** Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Cat.no.	Hersteller
Ammoniumchlorid	A9434	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Aqua ad injectabilia	6724092.00.00	B. Braun, Melsungen, D
BBL <sup>TM</sup> Todd Hewitt Broth	L007513	BD Bioscience, Heidelberg, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DMSO	472301	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
EDTA	14510	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol (70%, 99,9%)	T86.8, P076.1	Roth, Karlsruhe, D
FACS Clean	340345	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS Flow	342003	BD Bioscience, Heidelberg, D
FACS Shutdown Solution	334224	BD Bioscience, Heidelberg, D
FCS Gold	A15-649	PAA Laboratories, Pasching, A
Ficoll-Lympholyte-M (Density: 0,0875 g/cm <sup>2</sup> )	CL5031	Biozol Diagnostica GmbH, Eching, D
HBSS	H15-009	PAA Laboratories, Pasching, A
Hefeextrakt pulv.	2363	Carl Roth, Karlsruhe, D
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm (Durchstechflaschen)	3029843	Ratiopharm, Ulm, D

Fortsetzung auf der nächsten Seite

**Tabelle 2.1.13 – Fortsetzung**

Chemikalien	Cat.no.	Hersteller
HEPES	15630	Invitrogen, Darmstadt, D
Isofluran	HDG9623	Baxter GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	6752.3.8.5.6.2	Roth, Karlsruhe, D
Lipopolysaccharide from <i>Escherichia coli</i> (026:B6)	115K4013	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Nicht-Essentielle Aminosäuren	M7145	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Normales Maus Serum ODN1585	01-6501	Invitrogen, Darmstadt, D
PBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Penicillin/Streptomycin Lösung (50 µg/ml)	P11-010	PAA Laboratories, Pasching, D
RPMI 1640 Medium	E15-039	PAA Laboratories, Pasching, A
α- MEM mit GlutaMAX	32561	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
Sodium-Pyruvat, (110 mg/ml)	11360	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau	73K2420	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

### 2.1.7 Zytokin-, Protein- und Intracellular Staining Kits

**Tabelle 2.1.14:** Kits für intrazellulär-Färbungen und Zytokinmessungen

Kit	Cat.no.	Hersteller
Flow Cytomix Basic Kit mouse	BMS8440FF	eBioscience, Frankfurt, D
Flow Cytomix Simples TNFalpha	BMS8607/2FF	eBioscience, Frankfurt, D
Flow Cytomix Simplex IFNalpha, mouse	BMS86027FF	eBioscience, Frankfurt, D
Flow Cytomix Simplex IFNgamma, mouse	BMS8606/2FF	eBioscience, Frankfurt, D

Fortsetzung auf der nächsten Seite



**Tabelle 2.1.14 – Fortsetzung**

Kit	Cat.no.	Hersteller
Flow Cytomix Simplex IL-10, mouse	BMS8614/2FF	eBioscience, Frankfurt, D
Intracellular Staining Kit FoxP3, APC	77-5775	eBioscience, Frankfurt, D
BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific, Bonn, D

#### 2.1.8 Puffer und Medien

##### Erythrozyten-Lyse Puffer:

- 155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 10 nM EDTA, pH 7,4; entspricht:
  - 8,2 g NH<sub>4</sub>Cl (MW: 53,49)
  - 1,0 g KHCO<sub>3</sub> (MW: 100,12)
  - 3,7 mg EDTA-Na-Salz (Titriplex® III) (MW: 372,24)
  - Einen Liter Aqua Dest. hinzufügen und pH-Wert auf 7,4 einstellen; steril filtrieren

##### Verdau-Puffer (im Wasserbad 37°C vorwärmen) pro 1 Maus-Lunge

- 5 ml RPMI / 10%FKS / 1% Penicillin-Streptomycin Medium
- 700 µl Collagenase A (Roche)
- 5 µl DNase (Roche)

##### Paraformaldehyd 4%ig:

- 4 g Paraformaldehyd-Pulver
- 100 ml Aqua Dest.

##### *Klebsiella*-Einfriermedium:

- 32,5 ml Glycerol
- 5 ml MgSO<sub>4</sub> 10mM
- 1,25 ml TRIS 1M
- Ad 11,25 ml Aqua Dest.

##### *Klebsiella*-Kulturmedium

- 1 Röhrchen BBL™ Todd Hewitt Broth
- 1 ml 5% Hefeextraktlösung

### 2.1.9 Arzneimittel

- Aldara Creme, 5%, Wirkstoff Imiquimod

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierhaltung und Tierversuche

Die Versuchstiere wurden von Charles River, Sulzfeld, D bezogen und in die Tierhaltung der Justus-Liebig Universität Gießen aufgenommen. Je nach Versuch wurden Mäuse der Stämme C57BL/6N, C3H, 129SV, DBA und BALB/c im Alter von 7 bis 12 Wochen verwendet.

Die Tierexperimente erfolgten im Rahmen der Tierversuchsanträge 71/2009 und 29/2009.

Ex vivo Analysen von Inzuchtmausstämmen erfolgten im Rahmen der Tieranzeigen A2/2011, A25/2009.

### 2.2.2 Murine Zellisolation

#### 2.2.2.1 Gewinnung von murinem Lungenhomogenat

Das Abdomen des getöteten Tieres wird eröffnet und die Haut über dem Brustkorb entfernt. Anschließend muss das Zwerchfell eröffnet werden, ohne die Lunge oder Herz zu verletzen. Die Vena cava muss mit der Schere durchtrennt werden, genauso wird der linken Vorhof angeschnitten. Mit der Pinzette kann die Herzspitze gefasst und die rechte Herzkammer punktiert werden. Die Lunge wird anschließend mit 15 ml HBSS gespült, bis die Blutreste entfernt sind. Die einzelnen Lungenlappen müssen anschließend an Hauptbronchie abgetrennt und in eine leere Petrischale überführt werden. Auf die Lungenlappen wird Verdauopuffer pipettiert. Die Lungen werden zerkleinert, das Gewebe wird in ein Röhrchen mit Verdauopuffer überführt. Es folgt 1 Stunde Inkubation im Wasserbad bei 37 °C. Nach dem Verdau wird das Gewebe mittels Aspiration durch eine Kanüle noch einmal zerkleinert. Zum Schluss wird das Lungenhomogenat in die Spritze aufgezogen und durch einen 70 µm Zellsieb (Cell Strainer) ins 50 ml Falcon-Röhrchen filtriert. Eine Zentrifugation erfolgt, der Überstand wird abgekippt und nochmals gewaschen.

#### 2.2.2.2 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die Haut über der Trachea des toten Tieres wird geöffnet und das darunter liegende Gewebe zur Seite gezupft. Nach Freilegung der Luftröhre erfolgt zwischen zwei Knorpelspannen ein Einstich mit Hilfe einer Kanüle. Über die entstandene Öffnung wird eine auf ca. 1,5 cm gekürzte und umgebogene 21G-Kanüle eingeführt. Diese wird mit einem Vicrylfaden (4,0) durch Anbringen eines Knotens um Tubus und Trachea fest fixiert. Eine

Insulinspritze wird in die Kanüle eingesteckt. Die Durchführung der BAL erfolgt nach der 500 µl Spülung in 4 weiteren Schritten mit 400 µl Volumen.

#### 2.2.2.3 Anreicherung von murinen Zellsubpopulationen mit Hilfe der Magnetic Cell Separation (MACS)

Bei der MACS-Aufreinigung werden Antikörper, die mit kleinen Eisen-ummantelten Partikeln gekoppelt sind, gegen spezifische Zelloberflächenmarker eingesetzt. Die markierten Zellen laufen durch eine Säule, an die ein Magnetfeld angelegt wird. Dabei werden die markierten Zellen an die Säule gebunden. Die restlichen Zellen passieren die Säule und werden als negative Fraktion definiert. Anschließend kann auch die positive Fraktion gewonnen werden, indem das Magnetfeld aufgelöst wird und die durchlaufenden Zellen aufgefangen werden.

Generell bezeichnet man die Sortierung, in deren Verlauf die Zielzellen markiert werden, als positive Selektion. Werden nicht die gewünschten Zellen, sondern alle anderen mit Antikörper markiert, spricht man von einer Negativselektion. Sie kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn sich die Bead-Markierung der Zielzellen negativ auf die weiteren Versuche auswirkt.

Bei Markierung der Zellen mit erfolgten die Arbeitsschritte stets nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.3 In vitro Assays und Zellkulturmethoden

#### 2.2.3.1 Paraformaldehyd (PFA) Fixierung von Zellmaterial

Die Fixierung mittels Paraformaldehyd ist vor allem in der Immunhistochemie eine gängige Methoden, um die Struktur und Oberfläche des Gewebes für histologische Färbungen zu stabilisieren. Auch für durchflusszytometrische Analysen ist die Fixierung vitaler Zellen inzwischen gängig, besonders für intrazelluläre Färbungen. Paraformaldehyd ist jedoch auch toxisch und tötet infektiöse Erreger ab. Diese Wirkung wurde für die Experimente genutzt, in denen mit *Klebsiella pneumoniae* gearbeitet wurde, um die Zellsuspensionen garantiert frei von lebensfähigen Pathogenen weiterverarbeiten und analysieren zu können. Die keimfreien Kontrollen wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenfalls mit PFA behandelt

#### 2.2.3.2 CFSE Markierung

Um die Proliferation von naiven T-Zellen zu verfolgen, wurde die CFSE-Markierung verwendet. Der membrangängige Farbstoff CFDASE (Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester) bindet an die freien Amine cytoplasmatischer Proteine. Durch die Abspaltung von zwei Acetat-Gruppen bildet sich der Farbstoff CFSE, dessen Spektrum mit dem von

FITC vergleichbar ist. Seine intrazelluläre Konzentration halbiert sich mit jeder Zellteilung, da der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird. Über CFSE Fluoreszenz können anschließend mittels FACS sowohl die Zellteilungen nachvollzogen, sowie der Anteil der proliferierenden Zellen gemessen werden.

Für die Markierung wurden die zu markierenden Zellen  $1 \cdot 10^6$  pro ml in PBS gelöst und mit CFDASE in einer Konzentration von  $2 \mu\text{M}$  vereinigt. Eine Inkubation für 7 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad folgte. Mit 10 ml RPMI 1640 mit 10% FKS wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und noch einmal mit Medium aufgefüllt. Nach 15 min im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  konnten die markierten Zellen eingesetzt werden.

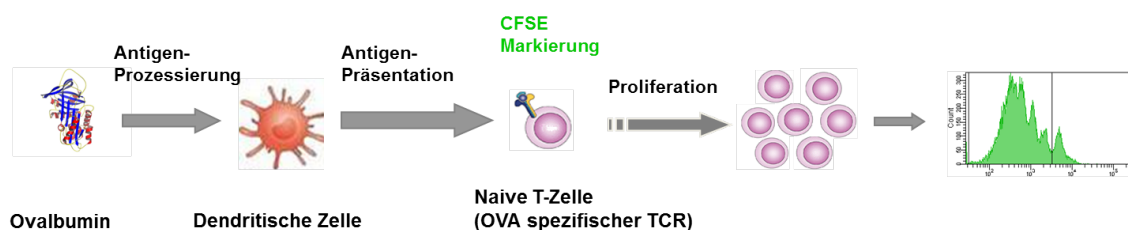
Am darauffolgenden Tag wurde die Messung einiger dafür vorgesehener Proben am FACS vorgenommen, um die initiale Fluoreszenz der Zellen im Versuch festzustellen. Mit diesen Anfangswerten wurden alle später gemessenen Proben abgeglichen.

### 2.2.3.3 Transgenes Modell der T-Zellproliferation

Die Analyse der Antigenpräsentation der dendritischen Zellen sowie ihrer Zytokinexpression erfolgte mittels eines in vitro Assays.

Hierzu wurden T-Zellen eingesetzt, die aus transgenen OT-II Mäusen gewonnen wurden. Ihre T-Zellen haben die Besonderheit, dass sie nur noch Rezeptoren einer Spezifität besitzen. Diese erkennen als einziges Antigen Ovalbumin. Um die Proliferation der T-Zellen via Durchflusszytometrie analysieren zu können, wurden sie mit CFSE markiert.

Als Stimulatoren werden in diesem System Dendritische Zellen eingesetzt. Diese können Ovalbumin durch Phagozytose aufnehmen und auf ihrer Oberfläche präsentieren. Je effektiver die Antigen-Präsentation im in-vitro System ist, desto mehr T-Zell-Proliferation kann gemessen werden.



**Abbildung 2.2.1:** Versuchsaufbau und Arbeitsschritte zur Analyse der T-Zellproliferation im transgenen OVA-Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde die T-Zellproliferation als Maß für die Fähigkeit der Dendritischen Zellen benutzt, Antigen aufzunehmen und zu präsentieren. Nach Ablauf der Inkubation von Stimulator und Responder (10:1) wurden die Wells geleert und abzentrifugiert. Die T-Zellproliferation wurde im FACS-Canto analysiert.

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Das am häufigsten angewandte Verfahren zum quantitativen Nachweis von Proteinen im Allgemeinen und Zytokinen im Besonderen stellt der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dar. Diese immunologische Nachweismethode wurde in den frühen 1970er Jahren erstmals beschrieben (Avrameas and Guilbert 1971; Engvall and Perlmann 1971).

Das Verfahren beruht auf dem Entstehen einer festen Bindung zwischen einem spezifischen Antigen mit einem entsprechenden Antikörper. Im Falle des ELISA wird zu Beginn des Nachweises ein *Capture*-Antikörper an eine Oberfläche, z.B. einer Mikrotiterplatte, gebunden. Auf diese Platte wird die zu messende Probe aufgebracht. Gibt es in diesem Sample ein Protein, das zu dem *Capture*-Antikörper passt, geht es eine feste Bindung mit ihm ein. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper dazu gegeben, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt ist. Zu dieser Konstellation wird im Anschluss ein Substrat gegeben, welches bei erfolgreicher Bindung der Einzelkomponenten in einer Reaktion umgesetzt wird, bei der es zu einer Verfärbung der Flüssigkeit in der Mikrotiterplatte kommt. Diese Farbreaktion ermöglicht unter Verwendung eines Photometers die Detektion von Antigen vom pg/ml bis ng/ml Bereich.

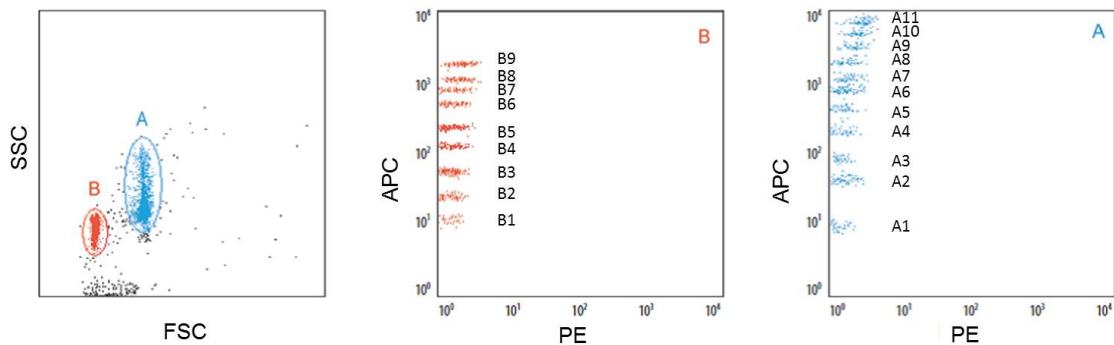
Es wurden vorgefertigte ELISA Kits der Firma Biolegend verwendet (ELISA MAX™ Standard Sets). Der ELISA wurde stets nach Herstellerangaben durchgeführt. Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden auf Eis aufgetaut. Für das jeweilige Zytokin wurde durch Verdünnungsschritte die optimale Auftragsmenge bestimmt. Für jeden Ansatz erfolgte eine Doppelbestimmung, um die Qualität der Messergebnisse zu verbessern. Die Konzentrationsbestimmung jeder Probe wurde durch Anlegen Standardreihe gemäß Herstellerangaben vorgenommen.

Die Extinktion der Proben wurde mit dem Photometer TECAN Sunrise (Crailsheim) bei der vom Hersteller angegebenen Wellenlänge gemessen. Die Ermittlung des absoluten Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe der Magellan Software V6.5. Alle Waschschrte erfolgten vollautomatisch durch den „ELISA-Platten-Washer“ TECAN Hydroflex (Crailsheim).

### 2.2.4.2 Messung von Zytokinen in Zellüberständen mittels Cytometric Bead Array

Der Cytometric Bead Array ist eine dem ELISA sehr ähnliche Methode der Quantifizierung von Proteinen in Überständen. Für die vorliegende Arbeit wurden die FlowCytomix Kits der Firma eBioscience verwendet. Mit diesem System können ein oder auch mehrere Proteine gleichzeitig aus einem sehr geringen Probenvolumen nachgewiesen werden (Simplex bzw. Multiplex Kits). Dies ist sowohl in einer 96-well Mikrotiterplatte als auch in FACS Tubes möglich. Das Testprinzip basiert auf Latexbeads, die unterschiedliche Größen aufweisen und nach Anregung mit einem Laser unterschiedliche Fluoreszenz zeigen.

Jede dieser Partikelarten ist mit einem Primärantikörper beschichtet, welcher spezifisch für das nachzuweisende Protein ist. Durch die unterschiedlichen Partikelgrößen sowie deren unterschiedlich starke Fluoreszenz ist der Nachweis von bis zu 20 Analyten simultan möglich. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proben wurden im FACS Canto II gemessen und mittels der zugehörigen Software ausgewertet.



**Abbildung 2.2.2:** Prinzip der Zytokinmessung mittels FlowCytomix System und Darstellung der maximal verwendbaren Bead Populationen, aufgeteilt nach Größe und Fluoreszenzintensität in APC (verändert nach <http://www.ebioscience.com/media/pdf/literature/flowcytomix-multiple-analyte-detection.pdf>).

#### 2.2.4.3 Proteinbestimmung aus der BAL

Die Proteinbestimmung aus der BAL der Versuchstiere wurde nach der BCA Methode mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher durchgeführt.

Die Proteinmessung mittels BCA verknüpft die Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem. Es kommt hierbei zunächst zur Komplexbildung von Protein mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion), anschließend werden die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Diese können durch Komplexbildung mit BCA mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 562 nm detektiert werden (Krohn, 2011).

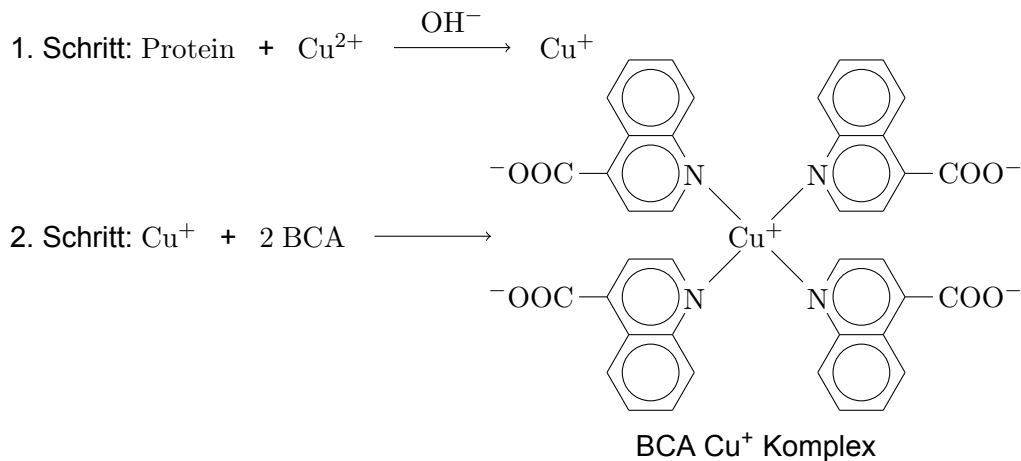
Der Messbereich des BCA Assays ermöglicht Messungen bis zu Proteinkonzentrationen von 5  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 2.2.5 Durchflusszytometrische Methoden

##### 2.2.5.1 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer bietet die Möglichkeit der qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen.

Das Durchflusszytometer wird im allgemeinen Sprachgebrauch als FACS (Fluorescence-activated cell sorter) bezeichnet. Fluoreszenzmarkierte Zellen werden in einem sehr feinen Flüssigkeitsstrahl vereinzelt und passieren nacheinander in sehr hohen Geschwindigkeiten



**Abbildung 2.2.3:** Darstellung der stattfindenden Reaktion bei Durchführung der BCA-Methode zur Proteinbestimmung; verändert nach Randall I. Krohn: The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein, 2011.

mehrere Laserstrahlen. Hierbei streuen sie das Laserlicht. Dabei werden die zellgebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Detektoren messen sowohl die Lichtstreuung, (Parameter zur Bestimmung der Größe und Granularität) als auch die Fluoreszenz-Emissionen. Dabei ist es möglich, simultan verschiedene markierte Antigene durch Kombination von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen zu messen. Voraussetzung sind Fluorochrome, die das Durchflusszytometer durch ihre unterschiedlichen Emissionsspektren unterscheiden kann und die deshalb getrennt voneinander detektiert werden können.

Generell können nicht nur Oberflächenmoleküle gemessen werden, sondern auch intrazelluläre Zytokine. Durch Verwendung von Detergenzien kann die Zellmembran permeabilisiert werden, so dass die Anfärbung von intrazellulären Antigenen ermöglicht wird.

Zusammenfassend ermöglicht die Durchflusszytometrie die Analyse und Unterscheidung von Zellen in einer Zellsuspension anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung.

Die Färbung der am FACS zu bestimmenden Zellen erfolgte für jeden Versuch nach dem gleichen Protokoll. Je nach Versuch wurden verschiedene Antikörperkombinationen eingesetzt.

Die Zellen wurden nach ihrer Gewinnung als Einzelzellsuspension mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  in ein FACS-Röhrchen überführt. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  Maus-Serum zugegeben, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu reduzieren. Es folgte die Zugabe der monoklonalen Antikörper. Die Zellsuspension wurde für 20 min auf Eis im Dunkeln gefärbt. Im Anschluss wurde das Röhrchen gewaschen und der Überstand durch Dekantieren entfernt. Schließlich erfolgte die Messung am FACS. Um tote Zellen zu diskriminieren, wurde Sytox Blue verwendet.

### 2.2.5.1.1 Mehrfach-Färbung leukozytärer Subpopulationen

Um die leukozytären Subpopulationen wurden mittels Mehrfach-Färbung durchflusszytometrisch analysiert (Hackstein et al. 2012b). Eine Zellprobe wurde mit bis zu 7 Antikörpern mit unterschiedlichen Fluorochromen gefärbt. Über mehrere Gating-Schritte konnte die einzelne Subpopulation durchflusszytometrisch dargestellt werden. Jede Analyse geht hierbei von als CD45 positiv definierten Leukozyten aus.

Panel		FITC	PE	PE-Cy7	PerCP-Cy5.5	APC	APC-Cy7	P-Blue			
Lympho1	antigen	TCR gd	CD3e	CD4	CD19	CD8a	CD45	CD49b			
	clone	GL3	145-2C11	GK 1.5	1D3	53-6.7	30-F11	DX5			
	Cat.No.	118106	100307	100406	551001	100712	103116	108918			
	company	Bio-legend	Biolegend	Biolegend	BDPharm.	Biolegend	Biolegend	Biolegend			
Lympho2/ Lin-neg cells	antigen	Lin-cocktail	CD3e	CD90.2	CD4		CD45	CD25			
	clone	see	145-2C11	53-2.1	GK 1.5		30-F11	eBio3C7			
	Cat.No.	below	100307	140310	100434		103116	48-0253-82			
	company		Biolegend	Biolegend	Biolegend		Biolegend	eBio-science			
DC	antigen	I-A/I-E	SiglecF	CD49b	CD11c	CD103	pDC/IPC-A647	CD45	CD11b		
	clone	M5/114.15.2	E50-2440	DX5	N418	2 E 7	120g8	30-F11	M1/70		
	Cat.No.	107606	562068	108908	117306	121416	DDX039A647	103116	101224		
	company	Bio-legend	Biolegend	Biolegend	Biolegend	Dendritics	Biolegend	Biolegend			
Mono/ Granulo	antigen	I-A/I-E	SiglecF	CD11c	CD11b	GR1	CD45	F4/80			
	clone	M5/114.15.2	E50-2440	N418	M1/70	RB6-8C5	30-F11	BM8			
	Cat.No.	107606	562068	117306	550993	108412	103116	123124			
	company	Bio-legend	Biolegend	Biolegend	BD Pharm.	Biolegend	Biolegend	Biolegend			
Tregs	antigen	CD127	CD39	CD3e	CD4	Foxp3	CD45	CD25			
	clone	A7R34	24DMS1	145-2c11	GK1.5	FJK-16s	30-F11	eBio3C7			
	Cat.No.	135009	12-0391-82	100320	100434	77-5775-40	103116	48-0253-82			
	company	Bio-legend	eBioscience	Biolegend	Biolegend	eBioscience	Biolegend	eBio-science			
Lineage cocktail		all FITC									
	antigen	CD3e	CD4	CD8a	CD45R/B220	TER-119	CD11b	CD11c	CD49b	FceR1	CD19
	clone	145-2C11	GK 1.5	53-6.7	RA3-6B2	TER-119	M1/70	N418	DX5	MAR-1	6D5
	Cat.No.	553058	100406	100706	103206	116206	101206	117306	108906	134306	115506
	company	BD Pharm	Biolegend								

**Tabelle 2.2.1:** Verwendete Antikörper/Fluorochrome für die Färbung leukozytärer Subpopulation der murinen Lunge für anschließende durchflusszytometrische Analyse.

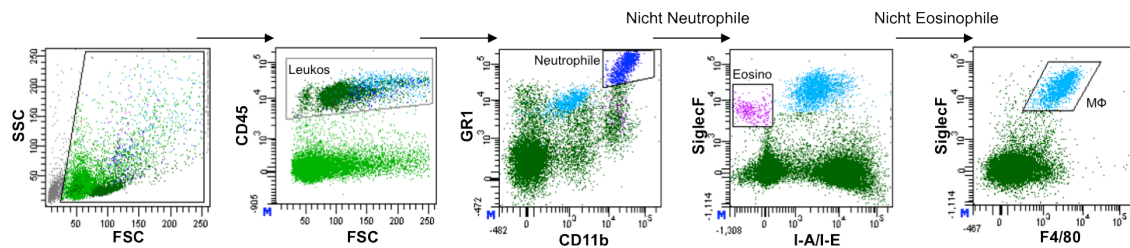
### 2.2.5.1.2 Makrophagen und Granulozyten

Alveolarmakrophagen und nonalveoläre Makrophagen sind in der vorliegenden Arbeit als respiratorische Makrophagen zusammengefasst. Ausgehend von den den Gesamt-Leukozyten können darüber hinaus eosinophile und neutrophile Granulozyten dargestellt werden. Die Gating-Strategie ist in Abb. 2.2.4 zusammengefasst.

### 2.2.5.1.3 Lymphozyten

Lymphozyten sind kleine Zellen, die im Scatter Plot aus SSC und FSC bereits als Population eingrenzbar sind. Aus den Lymphozyten lassen sich über verschiedene Marker





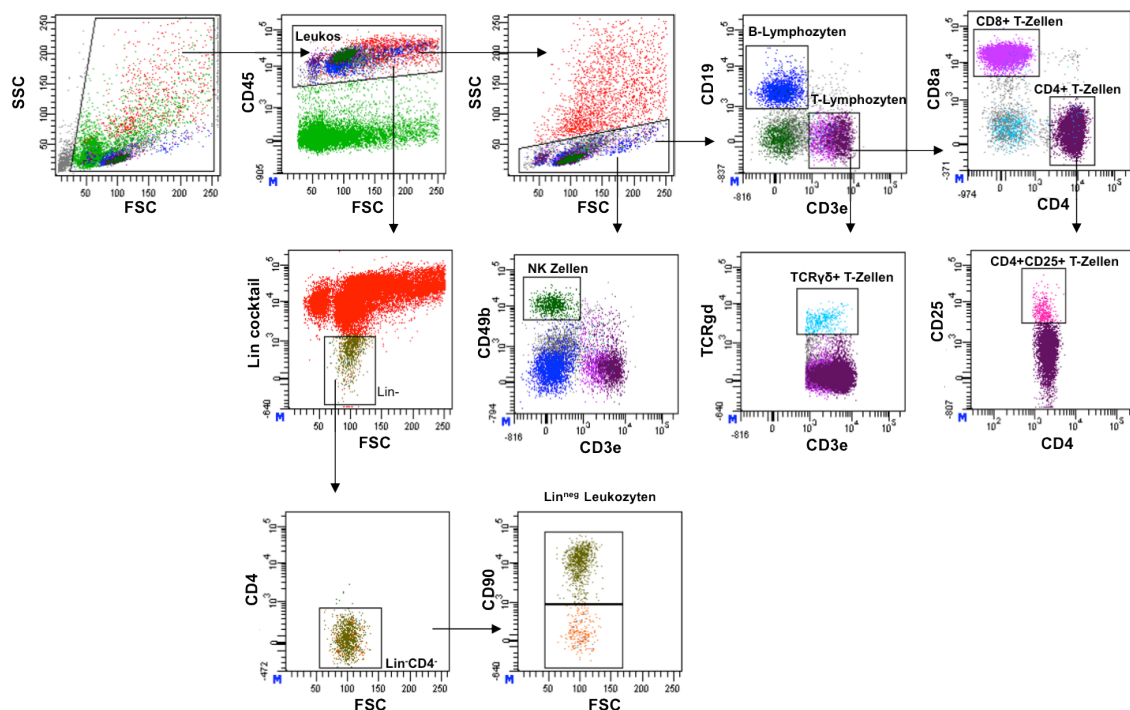
**Abbildung 2.2.4:** Gating der Respiratorischen Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats und der BAL; die Unterteilung wird mittels der Marker GR-1, CD11b, MHCII, SiglecF und F4/80 vorgenommen.

Subpopulationen definieren.

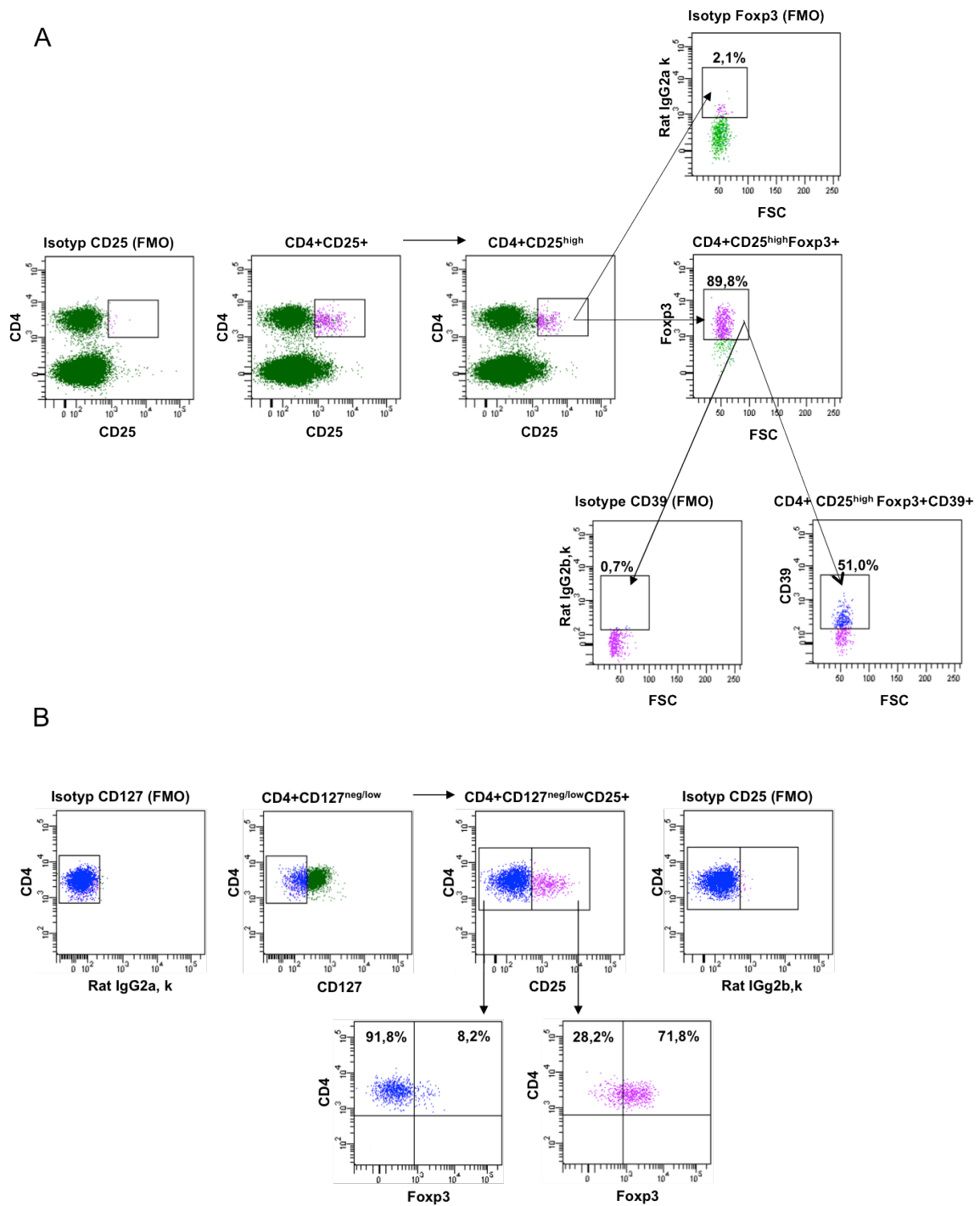
Mit Hilfe des Markers NK 1.1 können natürliche Killerzellen dargestellt werden. Unter Verwendung des eines Antikörpers gegen CD19 werden B-Zellen definiert.

CD3e (CD3-epsilon Polypeptid) ist ein Bestandteil des CD3-T-Zellrezeptorkomplexes und dient als Marker für alle T-Zellen. Die CD3e positiven Zellen lassen sich über CD4 und CD8 in Helferzellen und zytotoxische T-Zellen unterteilen sowie in gd-T-Zellen über die Expression des gd-T-Zell-Rezeptors (TCR gd). Aus CD4 positiven Zellen können über CD25 regulatorische T-Zellen dargestellt werden.

Verschiedene Subpopulationen Regulatorischer T-Zellen werden durch Expression von CD25, FoxP3, CD127 sowie CD39 definiert.



**Abbildung 2.2.5:** Gating der Lymphozyten und Lineage-negativen Leukozyten in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats; Ausgangspunkt ist der sogenannte ‚Lymph-Scatter-Plot‘, in dem die Ausgangszellpopulation mittels des Ausschlusses zu großer Zellen eingengt wird.



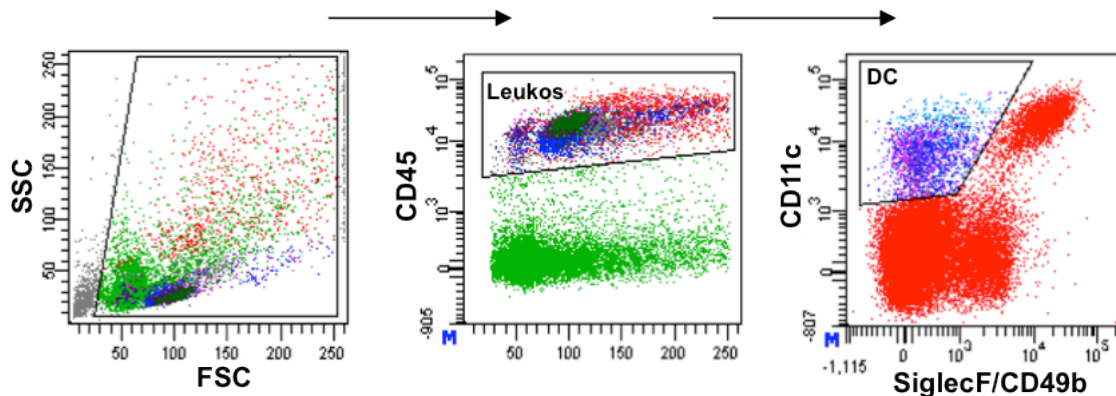
**Abbildung 2.2.6:** Gating der regulatorischen T-Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats

#### 2.2.5.1.4 Lineage-negative CD90<sup>+/neg</sup> Leukozyten

Diese Zellpopulation umfasst Lineage-Marker-negative Zellen, die zuerst in Infektionen mit parasitischen Würmern durch ihre Produktion von IL-13 sowie IL25 aufgefallen sind. Sie dienen als Vermittler von Th<sub>2</sub>-Antworten, indem sie zwei dafür essentielle Zytokine ausschütten (Barlow and McKenzie 2011; Koyasu and Moro 2011). Die Gating-Strategie ist in Abb. 2.2.5 zusammengefasst.

#### 2.2.5.1.5 Dendritische Zellen

Ausgehend von den Leukozyten werden die DC über CD11c und NK1.1/SiglecF definiert. Aus ihnen können über den Marker CD103 die CD103<sup>+</sup>DC dargestellt werden. Indem man das CD103 Gate invertiert, schließt man diese DC Subpopulation aus. Aus den restlichen Zellen können CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> sowie CD11b<sup>hi</sup>MHCII<sup>hi</sup>DC gegatet werden, indem man sie in einem Plot mit CD11b und MHCII darstellt. Die Population der



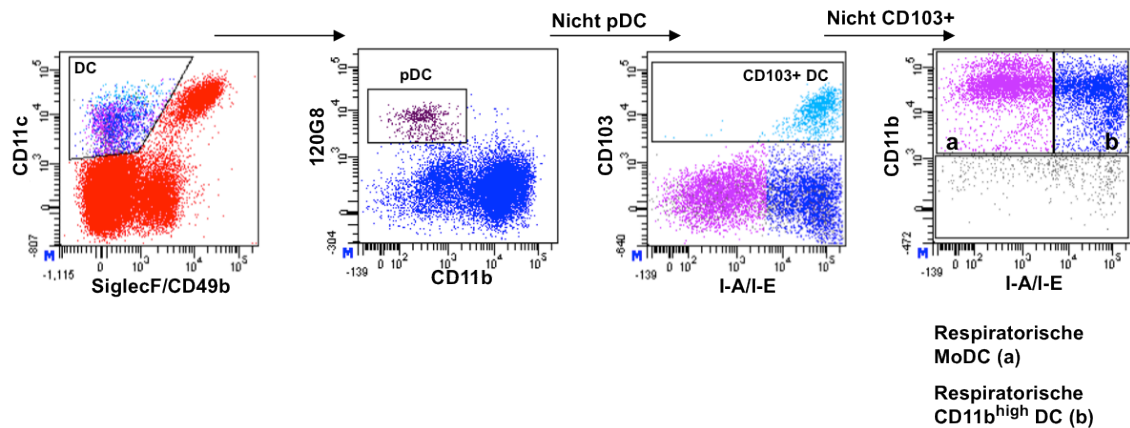
**Abbildung 2.2.7:** Gating der DC-Gesamtpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats

CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> wird bei Kim and Braciale 2009 als MoDC bezeichnet. Da gemäß neueren Publikationen (Plantinga et al. 2013) die MoDC wahrscheinlich präziser durch andere Marker definiert werden, wird das analysierte Subset im Folgenden nur als CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> bezeichnet.

Wenn man die CD11c positiven Zellen hinsichtlich ihrer Expression von 120G8 und CD11b analysiert, erhält man die Population der pDC als 120G8 positive und CD11b negative Zellen.

#### 2.2.5.1.6 Bestimmung absoluter Zellzahlen mit TruCount Tubes

Diese vorgefertigten FACS-Röhrchen enthalten eine bekannte Anzahl von fluoreszierenden Beads, welche unter einem Metallnetz am Boden des Röhrchens zurückgehalten werden. Die Aufnahme der Beads, die durch Zugabe der Probe aufgelöst werden, erfolgt die parallel zu den Zellen während der Messung im Durchflusszytometer. Bei der Aufnahme



**Abbildung 2.2.8:** Gating der DC-Subpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats; die Unterteilung wird mittels der Marker CD103, MHCII und CD11b aus CD11c positiven Leukozyten vorgenommen; MoDC bezeichnet hier Zellen des Phänotyps CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup>.

der Daten kann die Zahl der aufzunehmenden Beads fest eingestellt werden. Da das Volumen der in das Tube eingesetzten Zellsuspension bekannt ist, ist es möglich das während der Messung aufgenommene Volumen und die absolute Zahl an Zellen in der Zielpopulation errechnen. Folgende Formel diente zur Berechnung der Werte:

$$\frac{\text{Zahl der aufgenommenen Zellen}}{\text{Anzahl der aufgenommenen "Beads"}} \times \frac{\text{Anzahl der "Beads" pro Röhrchen}}{\text{Testvolumen}} = \text{Zellzahl im Testvolumen}$$

**Abbildung 2.2.9:** Formel zur Berechnung absoluter Zellzahlen in einem durchflusszytometrisch aufgenommenen Sample aus einem TruCount Tube

Die TruCount Tubes können für jede gefärbte Einzelzellsuspension sowie auch für Vollblut benutzt werden.

### 2.2.5.2 Zellsorting

Mittels Durchflusszytometer mit Sortiervorrichtung wie dem BD FACS Aria II und III können verschiedene Zellpopulationen analysiert und voneinander getrennt aufgefangen werden. Dazu wird der Probenstrahl nach der laserbasierten Zellcharakterisierung geregelt in sehr viele einzelne Tröpfchen verteilt. Durch die vorhergehende Analyse werden die Zellen den einzelnen Tropfen zugeordnet und die Tropfen mit den Zielzellen elektrostatisch geladen. Diese Zieltropfen können parallel im elektrischen Spannungsfeld von zwei Elektroden in bis zu vier verschiedene Probenröhrchen oder sogar als Einzelzellen in die Wells einer Mikrotiterplatte sortiert werden. Zur Zellsortierung werden die Zielpopulationen in der FACS Diva Software stringent definiert und dem Gerät werden die zu sortierenden Unterfraktionen vorgegeben. Die Zellsortierung erfolgte auf einem BD FACS Aria II sowie einem FACS Aria III mit FACS Diva Software (BD Biosciences).

#### 2.2.5.2.1 Sort definierter DC-Subpopulationen sowie Vergleichspopulationen aus der murinen Lunge

Um die definierten DC-Subpopulationen in vitro genauer untersuchen zu können, mussten sie hochrein aus murinem Lungenhomogenat gewonnen werden. Die Lungen der in der gewünschten Anzahl eingesetzten Mäuse der verschiedenen Inzuchtstämme wurden nach Protokoll aufgearbeitet und in Sort-Puffer aufgenommen. Eine kleine Menge von 500.000 Zellen wurde im Sorter analysiert, um darauf basierend das Gating der Zellpopulation durchzuführen. Hierbei wurde das Gating so durchgeführt wie für die Multicolor-Messung.

Aus der Gesamtpopulation der DC konnten 4 Subsets definiert werden:

pDC: 120G8 positiv/CD11b negativ

CD103 DC: CD103 positiv, MHCII positiv

Nach Ausschluss der CD103 positiven DC-Subpopulation:

CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup>: CD11b positiv/MHCII negativ

CD11b<sup>hi</sup>DC: CD11b positiv/MHCII positiv

Als Vergleichspopulationen dienten murine Makrophagen (SiglecF und F4/80 positiv) und Granulozyten (GR1 positiv/CD11b positiv). Nach Abschluss des Sorts wurden die Reinheiten der Populationen über eine Postsort-Analyse bestimmt.

#### 2.2.5.2.2 Sort naiver T-Zellen aus transgenen OVA-Mäusen

Naive T-Zellen wurden aus der Milz transgener OT-II Mäuse (C57BL6/N Hintergrund) gewonnen. Die naiven T-Zellen wurden nach Protokoll des T-Cell Isolation Kit II von Miltenyi Biotec angereichert. Um die naiven T-Zellen hochrein zu gewinnen, wurden diese anschließend mittels FACS Aria gesortet. Dazu wurde ein Antikörper Cocktail in PE verwendet, (CD8a, CD11b, CD11c, CD49b, CD45R und TER119), sowie CD44 in Pacific Blue, CD62L in PE-Cy7 und CD45 in APC-Cy7. Über den Lineage Cocktail wurden unerwünschte Zelltypen ausgeschlossen. Die restlichen Zellen wurden über CD62L und CD44 dargestellt, um die naiven T-Zellen zu sorten.

### 2.2.6 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.6.1 Herstellung von *Klebsiella pneumoniae* Stocks

Zur Herstellung von *Klebsiella pneumoniae* Stocks wurden drei Cryotubes des alten Stocks auf Eis aufgetaut. Im S2 Labor wurden drei Röhrchen BBL™ Todd Hewitt Broth mit je 1 ml flüssigem Hefeextrakt komplettiert. In jedes dieser Röhrchen wurde der Inhalt eines Cryotubes überführt. Diese wurden über Nacht in einem Brutschrank mit 37 °C bei 5% CO<sub>2</sub> mit leicht aufgedrehtem Deckel inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der entstandene Schleimpfropf mittels einer Eppendorf Pipette entnommen. Der Inhalt der drei Röhrchen wurde in einem 50ml Falcon vereinigt und gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9 ml Einfriermedium. Die Lösung wurde in 250 µl Aliquots auf zuvor vorbereitete Cryotubes verteilt. Diese Cryotubes wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Colony-forming-units (CFU), die ein Maß für die Menge der tei-lungsfähigen Bakterien in einem Stock darstellt, wurden zufällig drei verschiedene fri-sche Stock-Tubes ausgewählt. Diese wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:100.000.000 angesetzt. Von jeder der Verdünnungsstufen wurde auf zwei MacConkey Agarplatten jeweils 100µl ausplattiert und die Platten beschriftet. Diese verblieben über Nacht bei 37 °C 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Am folgenden Tag wurden die Platten ausgezählt. Die Zahl der CFU wurde über fol-gende Formel berechnet:

$$\left. \begin{array}{l} (\text{CFU Platte 1} + \text{CFU Platte 2})/2 * \text{Verdünnungsfaktor} + \\ (\text{CFU Platte 3} + \text{CFU Platte 4})/2 * \text{Verdünnungsfaktor} + \\ (\text{CFU Platte 5} + \text{CFU Platte 6})/2 * \text{Verdünnungsfaktor} + \end{array} \right\} /3 = \text{CFU/ml}$$

Basierend auf dieser Rechnung wurde die Anzahl der µl berechnet, mit der eine Infek-tion mit  $1 \cdot 10^4$  CFU pro Maus erreicht werden konnte.

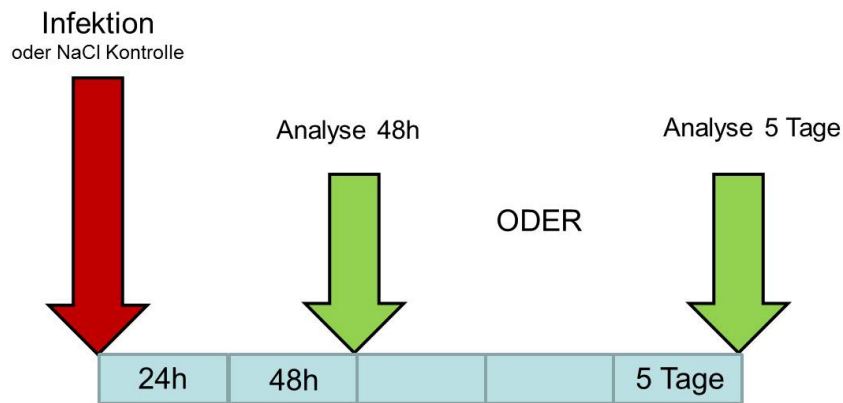
#### 2.2.6.2 Herstellung von Klebsiella Lysat

Zuerst wurde ein Klebsiella Stock hergestellt. Dessen Bakterienkonzentration wurde mit-tels Abgleich auf die McFarland Reihe bestimmt. Die Lösung wurde mit NaCl gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in NaCl aufgenommen. Anschließend wurden die Bak-terien durch 12 Minuten Inkubation im 65 °C warmen Wasser inaktiviert und das entstan-dene Lysat aliquotiert. Durch Ausplattieren eines Aliquots auf MacConkey Agar wurde sichergestellt, dass sich keine infektiösen Partikel mehr darin befanden.

#### 2.2.6.3 Intra-tracheale Applikation von *Klebsiella pneumoniae*

Die Klebsiella-infizierten Lungenhoognate wurden aus der Kooperation mit AG Lohmey-er, Innere Medizin, Universitätsklinikum Gießen gewonnen und untersucht. Die Infektion wurde im Rahmen dieser Kooperation in der Maus mittels intra-trachealer Applikation induziert. Dazu wurden  $1 \cdot 10^4$  CFU in einem Applikationsvolumen von 50 µl für die ge-wünschte Anzahl Tiere eingesetzt.

Die Auswertung der Infektion erfolgte 48 h sowie 5 Tage nach Infektion.



**Abbildung 2.2.10:** Auswertungsschema der Mäuse aus *Klebsiella*-infizierten Tieren, welche im Rahmen der Kooperation mit AG Lohmeyer, Innere Medizin, Universitätsklinikum Gießen gewonnen wurden

### 2.2.7 Immunhistologische Auswertung *Klebsiella pneumoniae*-infizierter Lungen

Für die Beurteilung des Schweregrades der Infektion bei den Versuchstieren wurde eine immunhistochemische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin der Mauslungen durchgeführt.

Dafür wurden pro Versuchsgruppe drei Proben der Lungen entnommen. Die Gewebeproben wurden in vierprozentigem Formalin fixiert. Danach wurden die Lungen gekühlt auf Eis verschickt. Die automatische Paraffineinbettung, das Anfertigen der Schnitte sowie die Standardfärbung mit Hämatoxylin/Eosin erfolgte nach Standardprotokoll durch die Kooperationsgruppe Achim Gruber, Berlin.

### 2.2.8 Statistische Auswertung der Messergebnisse

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe der GraphPad Prism Software.

Durchgeführt wurden eine Bestimmung des Mittelwertes, der Standardabweichung sowie Signifikanzanalysen. Diese erfolgten mittels ANOVA und Tukey post-Test. Hierbei wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  als signifikant angenommen.





# 3

## Ergebnisse

### 3.1 Heterogenität der respiratorischen leukozytären Subpopulationen und Dendritischen Zell-Subsets in Inzucht-Mausstämmen

#### 3.1.1 Vergleich der Gesamtleukozyten, respiratorischen Makrophagen, DC und Granulozyten

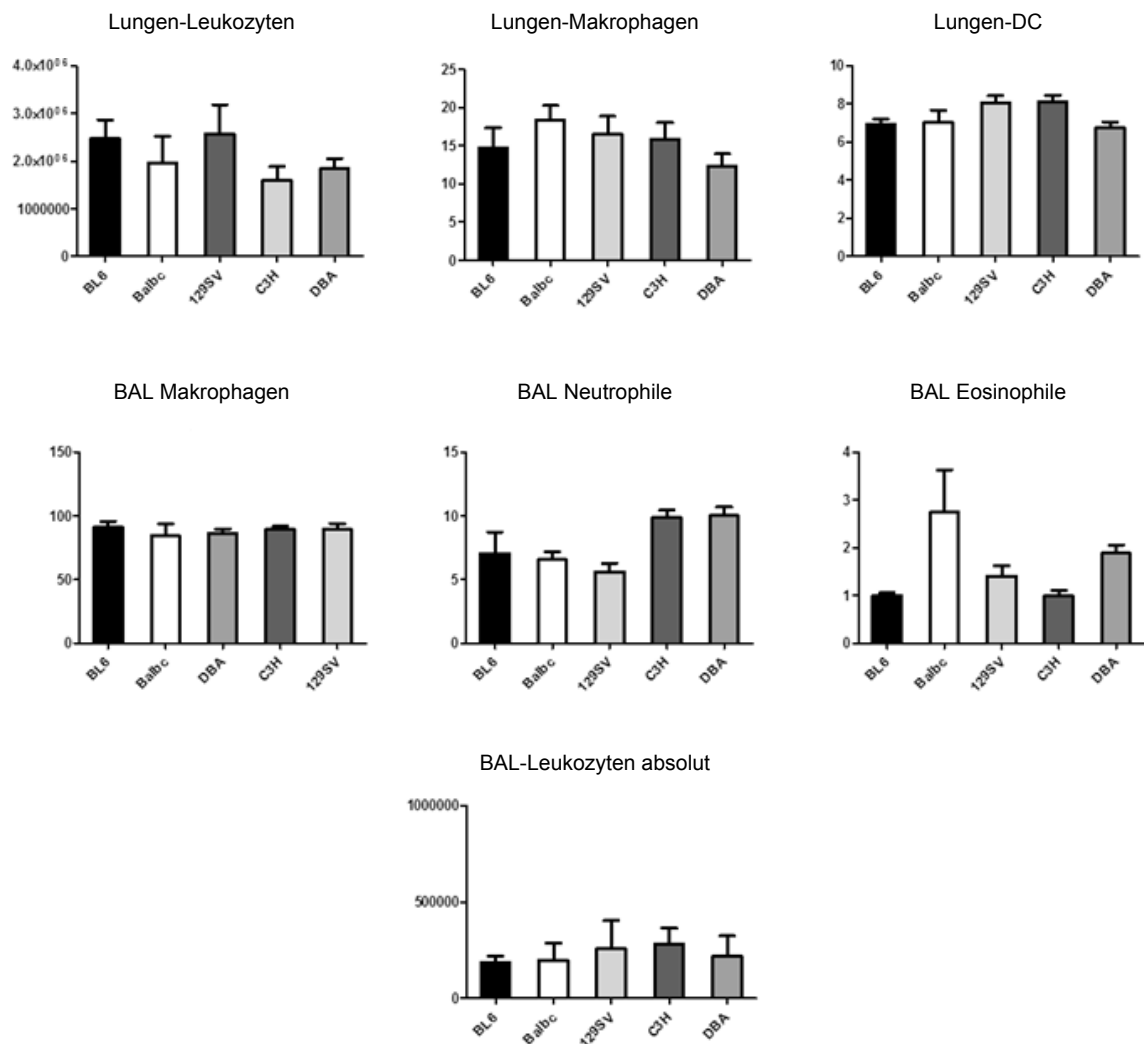
Der Vergleich verschiedener Immunzellpopulationen zeigte für die Gesamtheit der Leukozyten in der Lunge sowie der BAL, der Makrophagen in Lunge und BAL sowie der DC keine deutlichen Unterschiede zwischen den Inzucht-Mausstämmen.

Deutliche Unterschiede sind bei den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten erkennbar. Bei der C3H und DBA Maus haben die Neutrophilen einen größeren Anteil an den Gesamtleukozyten als in den anderen Mausstämmen. Die BALB/c Mäuse zeigen den höchsten prozentualen Wert für eosinophile Granulozyten, gefolgt von der DBA und 129Sv Maus.

#### 3.1.2 Vergleich der respiratorischen DC-Subpopulationen

Der Vergleich der respiratorischen DC-Subpopulationen zeigte große Heterogenität zwischen den Maus-Inzuchtstämmen, obwohl die Gesamtzahl an DCs in allen Stämmen vergleichbar ist.

Es zeigen sich signifikant erhöhte pDC Anzahlen 129Sv Mäusen im Vergleich mit den anderen Stämmen. CD103<sup>+</sup>DC sind im Vergleich zu C57BL/6, 129Sv und DBA-Mäusen



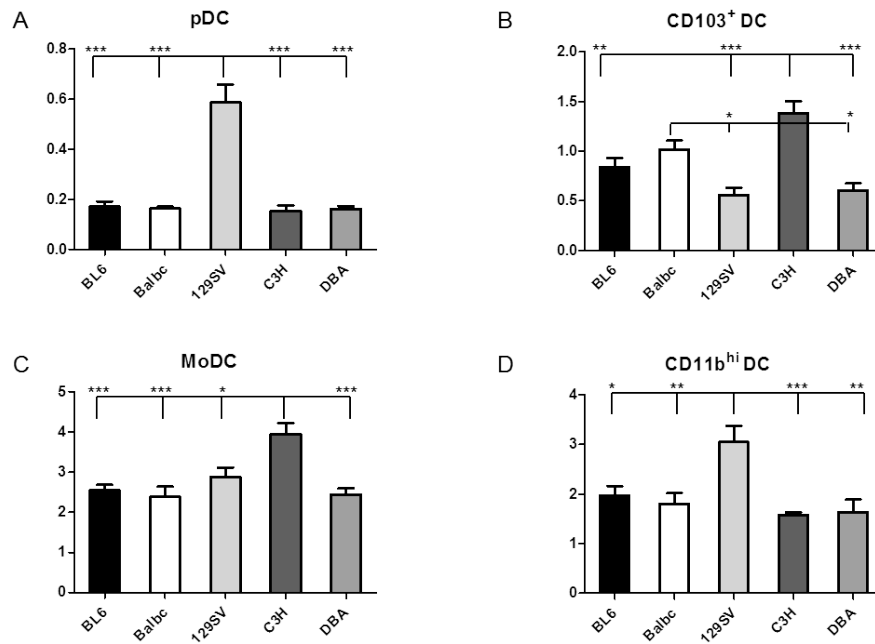
**Abbildung 3.1.1:** Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von Leukozytensubpopulationen zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen mittels *Multicolor*-Analyse. Gemessen wurden Gesamtleukozyten in Lunge und BAL, der respiratorischen Makrophagen in Lunge und BAL sowie von Lungen DC und Neutrophilen in den Stämmen BL6/N, BALB/c, 129Sv, C3H und DBA ( $n \geq 8$ ).

in C3H Mäusen deutlich höher. Die Subpopulation der  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$  ist ebenfalls in C3H Mäusen signifikant größer als in den anderen Stämmen.

### 3.1.3 Vergleich der respiratorischen Lymphozyten

Die Analyse der respiratorischen Lymphozyten ergibt einen deutlich höheren Anteil von Gesamt-T-Zellen und Helferzellen in BALB/c Mäusen. Die Subpopulation der T-Killerzellen ist in C57BL6/N Mäusen am größten, signifikant erhöht im Vergleich mit C3H und DBA Mäusen. Der Anteil putative regulatorischer T-Zellen zeigt sich signifikant erhöht in 129Sv Mäusen im Vergleich zum C57BL6/N und C3H Stamm.

B-Lymphozyten stellen in C57BL6/N Tieren einen deutlich höheren Anteil der Gesamtleukozyten als in anderen Inzuchtmäusen. Der Anteil von NK-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist



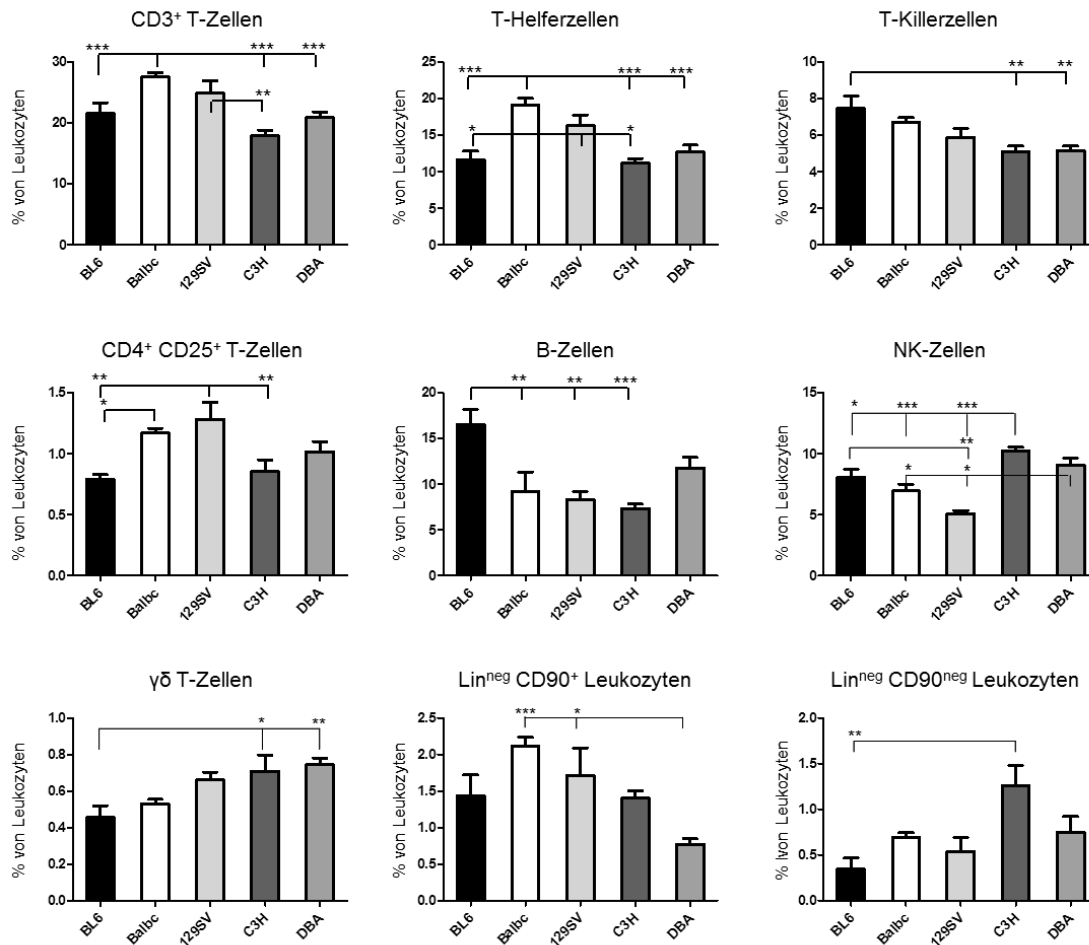
**Abbildung 3.1.2:** Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von respiratorischen DC-Subpopulationen zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen mittels *Multicolor*-Analyse. Gemessen wurden pDC, CD103<sup>+</sup>DC, MoDC und CD11b<sup>hi</sup>DC in den Stämmen BL6/N, BALB/c, 129Sv, C3H und DBA (n ≥ 8); \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; MoDC bezeichnet hier Zellen des Phänotyps CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup>.

besonders in C3H und DBA Mäusen sehr hoch. BALB/c und 129Sv Mäuse zeigen die höchsten prozentualen Anteile von in Lin<sup>neg</sup>CD90<sup>+</sup> Leukozyten, wohingegen C3H Tiere besonders hohe Anzahlen von Lin<sup>neg</sup>CD90<sup>neg</sup> Leukozyten zeigen.

### 3.1.4 Vergleich der Zytokinproduktion von respiratorischen Lymphozyten nach Stimulation

Hierbei zeigt sich, dass in BALB/c Mäusen viel höhere Menge von TNF-alpha sowohl nach CD3/28 als auch nach LPS Stimulation produziert werden können. Nach Stimulation durch CpG zeigten sich jedoch keine Mausstamm-spezifischen Unterschiede. Hinsichtlich der Interferon-gamma Produktion lässt sich feststellen, dass nach CD3/28 Stimulation die BALB/c Leukozyten signifikant mehr produzieren als der Ansatz mit C57BL6/N Leukozyten. Die Produktion des anti-inflammatorischen Interleukin-10 ist ebenfalls in BALB/c Proben nach Stimulation mit CD3/28 am höchsten. Dagegen ist die Ausschüttung von Interleukin-10 durch die Leukozyten der BALB/c Mäuse nach Stimulation mit CpG signifikant geringer als in C57BL6/N Leukozyten.

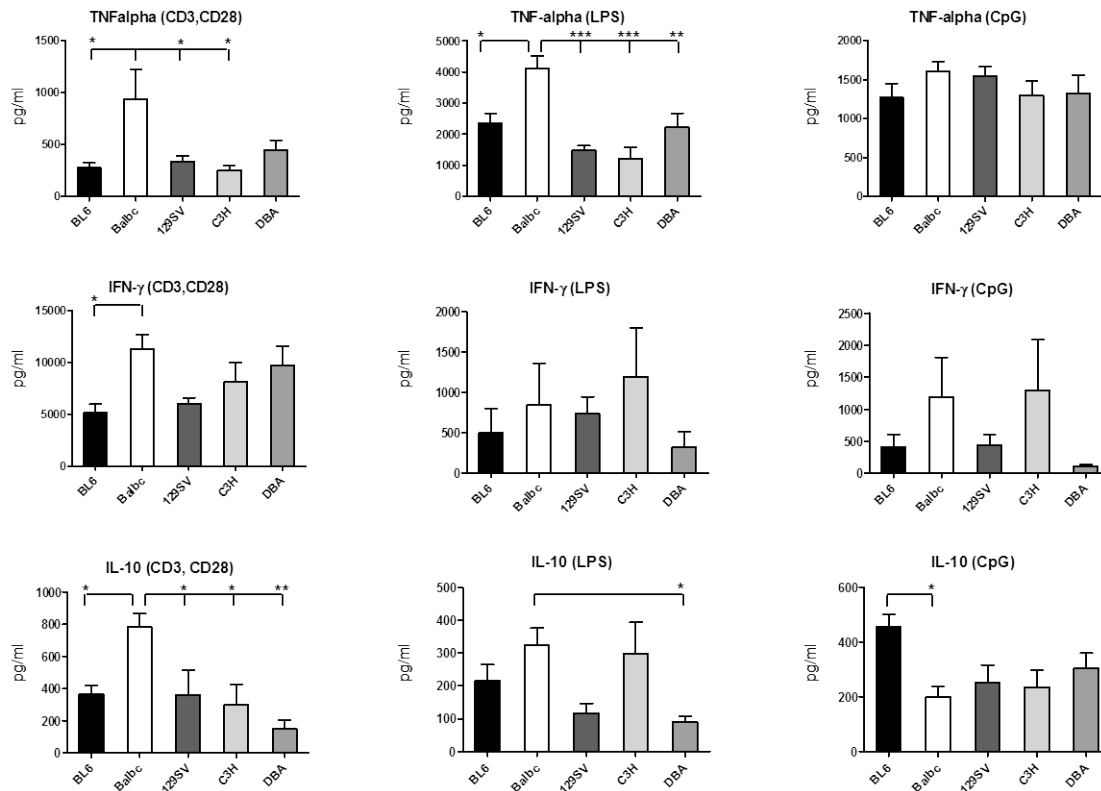
Es ist, bezogen auf die Zytokinproduktion, ebenfalls eine Heterogenität zwischen den verschiedenen Mausstämmen vorhanden. BALB/c Mäuse scheinen insgesamt das höchste Potential zur Zytokinausschüttung zu haben, wohingegen DBA Mäuse in den meisten Ansätze die geringsten Zytokinmengen produzieren.



**Abbildung 3.1.3:** Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von respiratorischen Leukozyten-Subpopulationen mittels Multicolor-Analyse zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen (BL6, BALB/c, 129Sv, C3H und DBA;  $n \geq 8$ ); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.1.5 Vergleich der respiratorischen regulatorischen T-Zellen

Basierend auf den erhöhten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen in BALB/c und 129Sv Mäusen wurden diese Zellen hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu Subpopulationen regulatorischer T-Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass BALB/c und 129Sv Mäuse signifikant höhere Anzahlen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/neg</sup> regulatorischen T-Zellen im Vergleich mit C3H und DBA Mäusen besitzen. C57BL6/N Mäuse haben vergleichbare Anzahlen wie BALB/c hinsichtlich der Subpopulationen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup>.



**Abbildung 3.1.4:** Durchflusszytometrische Untersuchung der Zytokinproduktion von Micro-bead-aufgereinigten respiratorischen Leukozyten nach Stimulation mit CD3/28, CpG ODN 1826 und LPS mittels Cytometric Bead Array ( $n \geq 5$ ); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

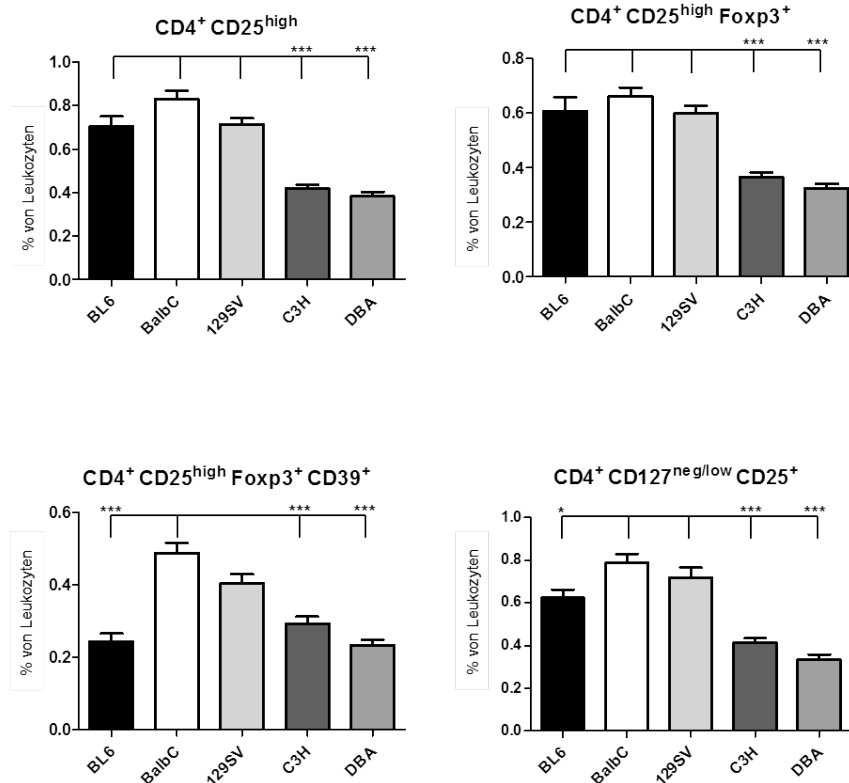
## 3.2 Quantitative Analyse leukozytärer Subpopulationen in der experimentellen *Klebsiella*-Pneumonie in C57BL6/N Mäusen

### 3.2.1 Nachweis der Manifestierung einer gram-negativen Pneumonie

#### 3.2.1.1 Allgemeines

Die Auswertung der Zellpopulationen erfolgte durchflusszytometrisch. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse in den jeweiligen Gruppen wurden gemittelt. Für die statistische Auswertung lag eine Zahl von mindestens 3 Tieren pro Gruppe zugrunde.

Bei der Auswertung ist zu beachten, dass die Leukozytose während der Pneumonie zu einer Verzerrung der prozentualen Anteile führt. Das bedeutet, dass bezogen auf die große Menge eingewanderten Leukozyten der Anteil einer bestimmten Immunzellpopulation geringer werden kann. Dies führt dazu, dass die Prozentwerte einer Population in infizierten Tieren niedriger sein können als in gesunden.

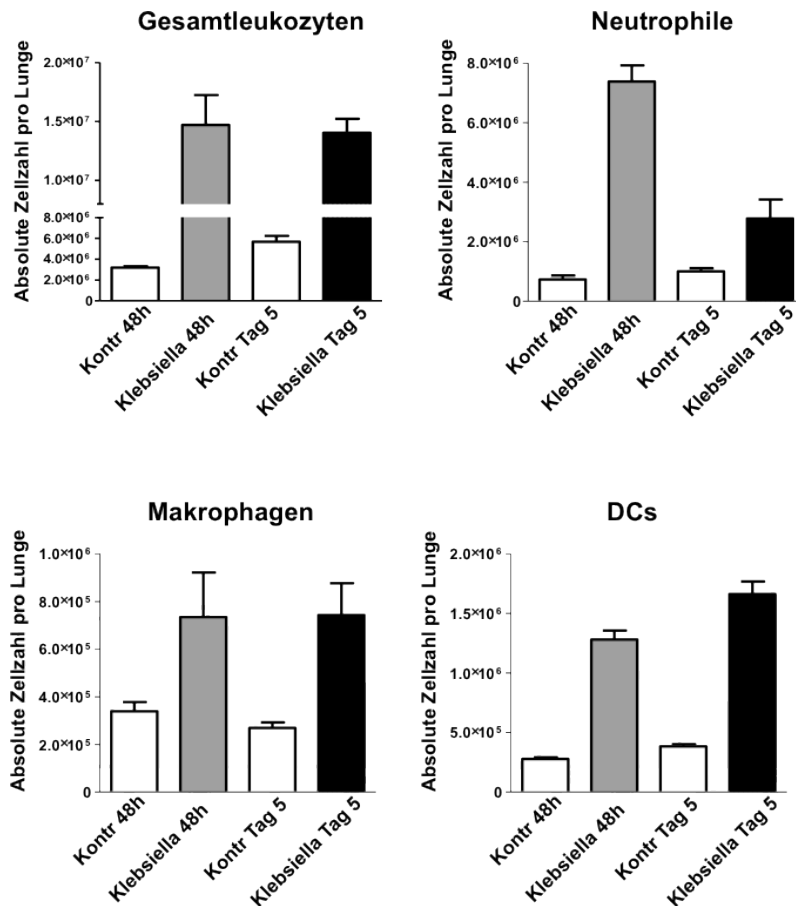


**Abbildung 3.1.5:** Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von respiratorischen Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zell- Subpopulationen mittels *Multicolor*-Analyse (extra-/intrazelluläre Färbung) zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen (BL6, BALB/c, 129Sv, C3H und DBA; n ≥ 5); \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

### 3.2.2 Gesamtleukozyten, Makrophagen, Gesamt-DC und Neutrophile in der Lunge

In den Lungen von infizierten Tieren lässt sich ein deutlicher Anstieg der Gesamtleukozyten, Makrophagen, DC sowie Neutrophilen 48 h nach Infektion feststellen.

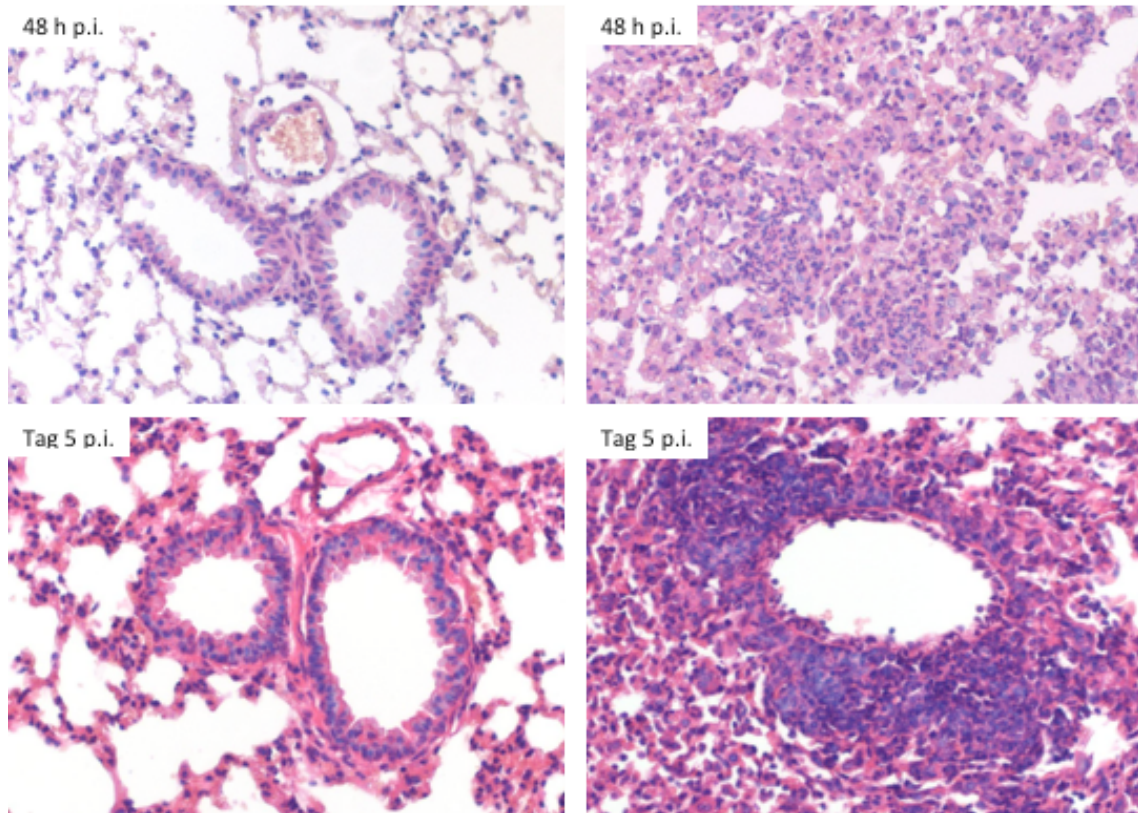
An Tag 5 sinkt die Zahl der Neutrophilen deutlich, der Wert bleibt im Vergleich zur Kontrolle nur leicht erhöht. Die Zahl der Makrophagen am Infektionsort bleibt stabil, die Anzahl der Gesamt-DC steigt noch etwas an.



**Abbildung 3.2.1:** Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung der Lunge hinsichtlich Gesamtleukozyten, Makrophagen, Gesamt-DC und Neutrophilen mittels *Multicolor*-Analyse in Klebsiella-infizierten C57BL6/N Mäusen und gesunden Kontrolltieren. Es wurden absolute und relative Werte 48h und 5 Tage nach Infektion bestimmt ( $n \geq 3$ ).

### 3.2.2.1 Histologische Befunde

Für die Histologie wurden Lungen infizierter und nicht-infizierter Versuchstiere 48h sowie 5 Tage nach der Operation verglichen.



**Abbildung 3.2.2:** Histologische H&E Präparate Klebsiella-infizierter Mäuse 48 h und 5 Tage nach Infektion sowie dazugehöriger Kontrolltiere; in Kooperation mit Achim Gruber, Olivia Kershaw (Charité Berlin), Inna Schevtschenko (Universität Gießen).

Die mikroskopischen Untersuchungen der Präparate ergaben für die Kontrollen 48 h und 5 Tage eine geringgradige, akute Stauungshyperämie. Diese ist auf die Euthanasie zurückzuführen. Es konnten keine entzündlichen Veränderungen des Lungengewebes nachgewiesen werden. Die Histologie entspricht im Wesentlichen der gesunden Lungengewebes.

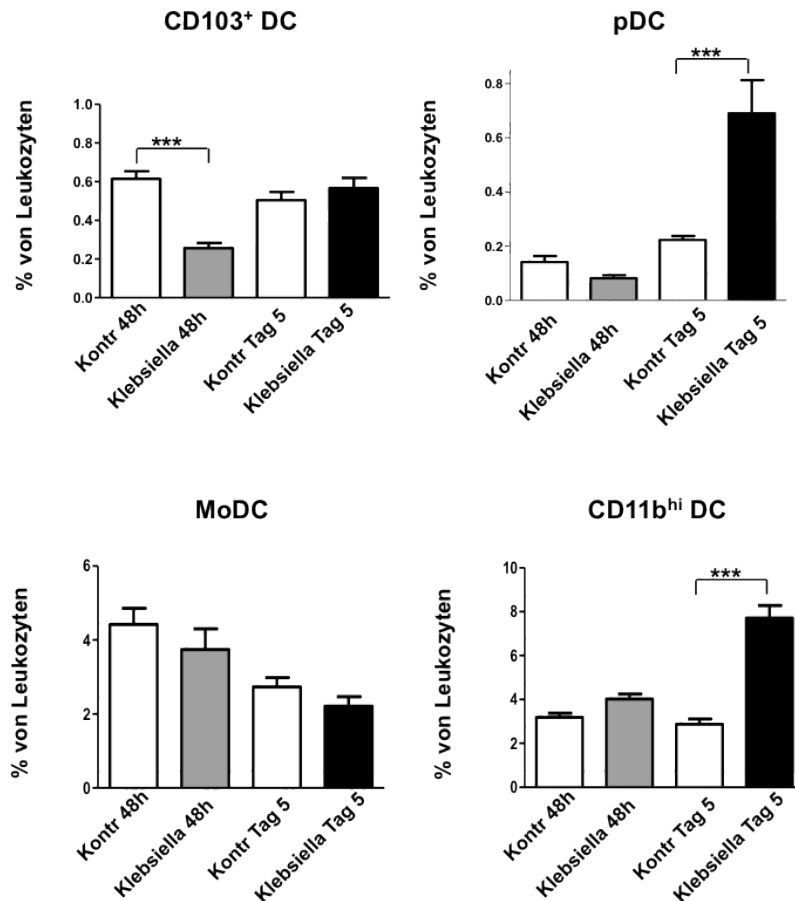
Die Präparate der Tiere 48 h nach Infektion wiesen eine hochgradige, multifokale Pneumonie auf. Diese zeigte sich nekrotisierend-eitrig mit partieller Parenchymkonsolidierung sowie einem perivaskulärem, entzündlichem Ödem.

Die Präparate der Tiere 5 Tage nach Infektion zeigen nach wie vor den Zustand einer eitrigten Pneumonie mit teils flächiger Parenchymkonsolidierung an. Die analysierten Lungen weisen eine massive Infiltration von Lymphozyten in Form einer Lymphozytenmanschette auf. Die Mikroskopie zeigt außerdem eine Endothelaktivierung an sowie eine Leukozytostase, die untersuchten Lungen weisen ausgeprägte Läsionen auf. Eine einsetzende Regeneration wird durch eine Typ II Pneumozytenhyperplasie deutlich.



### 3.2.3 Quantitative Bestimmung respiratorischer DC-Subpopulationen in der experimentellen *Klebsiella*-Pneumonie

#### 3.2.3.1 $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$ , $CD11b^{hi}MHCII^{hi}$ DC, $CD103^+$ DC und pDC



**Abbildung 3.2.3:** Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$  mittels *Multicolor*-Analyse. Die Lunge der *Klebsiella*-infizierten C57BL6/N Mäusen und gesunden Kontrolltiere wurde 48 h und 5 Tage nach Infektion analysiert ( $n \geq 3$ ); MoDC bezeichnet hier Zellen des Phänotyps  $CD11b^+MHCII^{neg/low}$ .

Die Diskriminierung der vier DC-Subpopulationen zeigt, dass die beobachtete Gesamtentwicklung der DC über die Dauer der Infektions sich aus den Einzeleffekten der Subsets zusammensetzt. Deren Quantität verändert sich sehr unterschiedlich über die Dauer der Infektion.

Der relative Anteil der  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$  an der Leukozytengesamtheit sinkt über die Dauer der Infektion Experimentes ab, wobei dieser Effekt sowohl in Kontrolltieren als auch in infizierten Versuchstieren auftritt.

Der relative Anteil der  $CD11b^{hi}MHCII^{hi}$  steigt von 48 h zu Tag 5 signifikant und spezifisch für die mit *Klebsiella* infizierten Tiere an. An Tag 5 zeigt sich der relative Wert in den infizierten Tieren mehr als doppelt so hoch als in den Kontrolltieren. Der relative Anteil der  $CD103^+$  DC zeigt sich in infizierten Versuchstieren 48 h nach der Infektion signifikant erniedrigt. An Tag 5 erreicht der prozentuale Wert der  $CD103^+$  DC das Niveau

der Kontrolle.

Die Subpopulation der pDC ist die kleinste DC Population und bildet in den Kontrollen ca. 0,2% aller Leukozyten der Lunge. In den infizierten Tieren zeigt sich 48 h nach Infektion kein Unterschied zwischen infizierten Versuchstieren und nicht-infizierten Kontrollen.

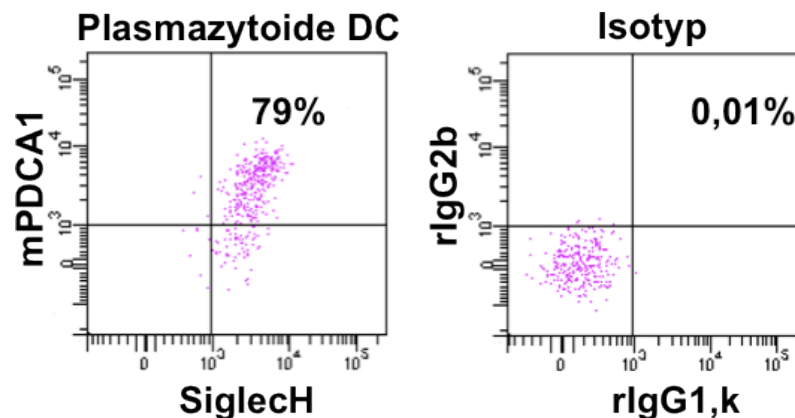
Relativ ist bis Tag 5 nach Infektion ein signifikanter Anstieg der pDC im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle.

### 3.3 Verifizierung der Analyse plasmazytoider DC

Die Messung der pDC im Verlauf der Pneumonie ließ eine zusätzlich Überprüfung der Messergebnisse sinnvoll erscheinen. Daher wurde die pDC Fraktion zusätzlich mit SiglecH sowie mPDCA-1 gefärbt und ihre IFN $\alpha$  Produktion untersucht.

#### 3.3.1 Analyse der Expression von SiglecH und mPDCA-1

Die Expression der Markermoleküle SiglecH (sialic acid binding immunoglobulin-like lectin H; Blasius and Colonna 2006) und mPDCA-1 (mouse plasmacytoid dendritic cell antigen 1; Sung et al. 2006) ist für die Subpopulation der pDC wie der Marker 120G8 spezifisch. Hierbei binden 120G8 und mPDCA-1 an das gleiche Molekül, jedoch unterschiedliche Epitope.



**Abbildung 3.3.1:** Durchflusszytometrische Untersuchung putativer pDC mittels *Multicolor*-Analyse. Die DC-Subpopulation wurde in Klebsiella-infizierten C57BL6/N Mäusen 5 Tage nach Infektion analysiert. Von den 120G8+CD11b- pDC sind 85% ebenfalls positiv für mPDCA-1 und SiglecH.

Als interne Kontrolle wurden im Vergleich zur Gruppe der pDC auch die Nicht-pDC Fraktionen hinsichtlich der Expression der beiden Oberflächenantigene untersucht. Als Nicht-pDC Fraktionen wurden hier Zellen definiert, die positiv für CD11c, jedoch negativ für 120G8 sowie positiv oder negativ für CD11b sind.

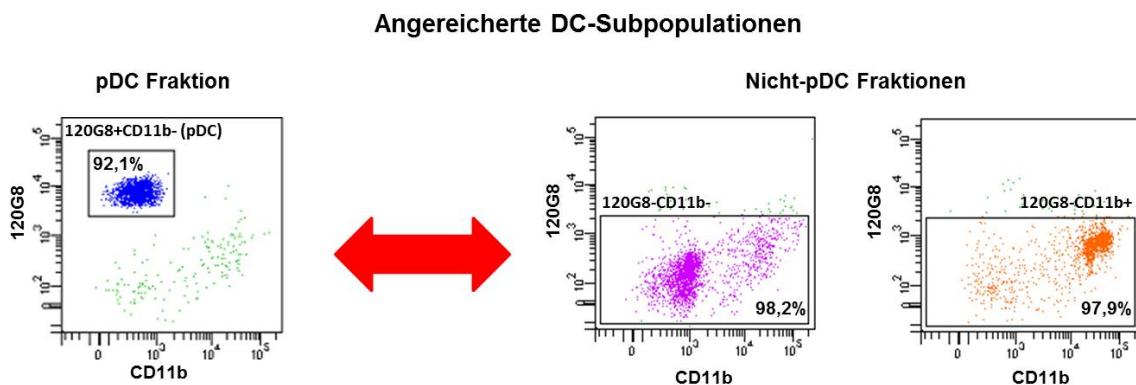
Von den Zellen der gesamten pDC Fraktion konnten in der durchflusszytometrischen Analyse 84,8% als positiv für beiden Marker SiglecH und mPDCA-1 dargestellt werden.

Die Nicht-pDC Fraktionen zeigten praktisch keine Expression, da nur eine statistisch irrelevante Anzahl an Zellen für einen der beiden Marker schwach positiv erschienen. Isotypkontrollen wurden mitgeführt, es konnte keine signifikante unspezifische Bindung des Antikörpers festgestellt werden.

### 3.3.2 Analyse der IFN $\alpha$ Produktion

Als weiterer Nachweis für die Identität der als pDC gemessenen Zellen wurde die charakteristische Produktion von großen Mengen IFN $\alpha$  nach Stimulation benutzt.

Hierfür wurden die pDC sowie die Nicht-pDC Fraktionen hochrein aus Lungen von infizierten Mäusen an Tag 5 nach Infektion gesortet. Ihre Reinheit betrug in der Postsort-Analyse in allen Fraktionen über 92%. Jede Subpopulation wurde für 24 Stunden mit ODN1585 stimuliert.



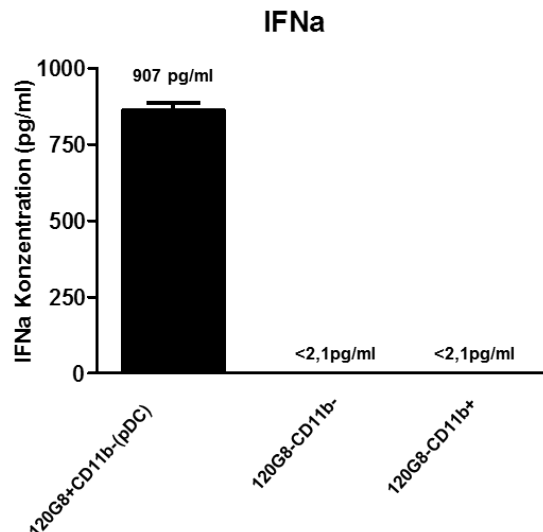
**Abbildung 3.3.2:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit gesorteter DC-Subpopulationen mittels *Multicolor*-Analyse. Die DC-Subpopulationen aus *Klebsiella*-infizierten C57BL6/N Mäusen wurden 5 Tage nach Infektion auf die Expression von 120G8 und CD11b untersucht ( $n \geq 3$ ).

Die entnommenen Überstände wurden hinsichtlich ihres Gehaltes an IFN $\alpha$  untersucht (FlowCytomix Simplex, Fa. Ebioscience). Die Analyse ergab, dass die Konzentration an IFN $\alpha$  in den Überständen der Nicht-pDC Fraktionen unter dem Detektionslimit des Tests lag.

In den Proben der pDC Fraktion ergab sich eine Konzentration von 907 pg/ml IFN $\alpha$ . Somit zeigte lediglich die als pDC bezeichnete Zellfraktion eine deutliche Produktion von IFN $\alpha$ .

### 3.4 Antigenpräsentation und T-Helferzellproliferation durch definierte, *Klebsiella*-aktivierte DC-Subpopulationen

Die Fähigkeit, Antigen auf der Oberfläche an CD4-T-Helferzellen zu präsentieren und deren Proliferation anzuregen, ist unter den DC-Subpopulationen sehr unterschiedlich ausgeprägt.



**Abbildung 3.3.3:** Untersuchung mit ODN-stimulierter DC-Subpopulationen mittels CBA (Cytometric Bead Array). Analysiert wurden putative pDC sowie zwei Nicht-pDC Fraktionen ( $n \geq 3$ ).

Das stärkste stimulatorische Potential weisen die  $CD103^+$ DC auf, die über 90% der zugesetzten naiven  $CD4$  T-Zellen aktivieren können. Die  $CD11b^{hi}$  DC wirken ebenfalls stark proliferationsstimulierend und können durchschnittlich über 60% der naiven T-Zellen im Ansatz zur Proliferation anregen.

Qualitativ zeigt sich, dass die von den  $CD103^+$ DC stimulierten Helferzellen über die Dauer des Experiments mehr Teilungen vollziehen, als die im Ansatz mit  $CD11b^{hi}$ DC.

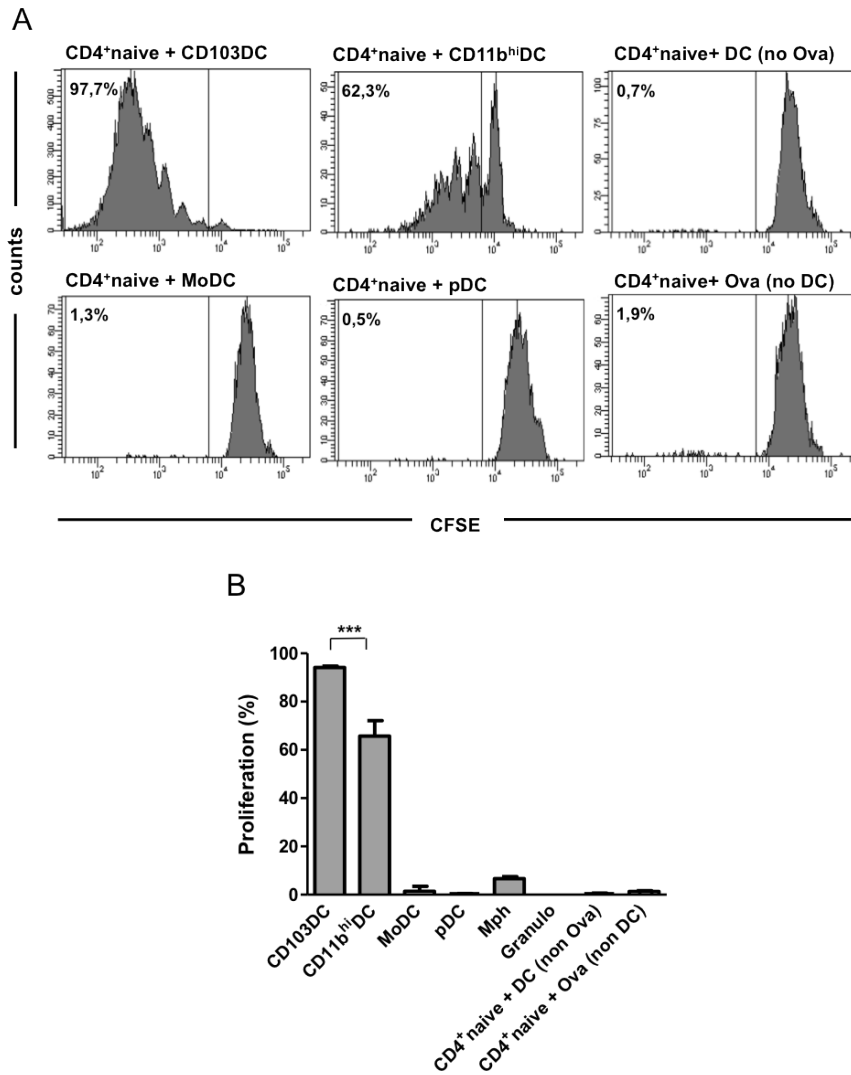
Weder  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$  noch pDC sind in der Lage, die Proliferation der naiven T-Zellen anzuregen. Auch die internen Kontrollen mit Granulozyten und Makrophagen zeigen keine Proliferation.

### 3.5 Charakterisierung der Expression von Aktivierungsmarkern auf DC-Subpopulationen

#### 3.5.1 CD86 und MHCII

Der Reifungsgrad der DC-Subpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie genauer untersucht. Als Hauptmerkmale der Reifung und Aktivierung dienten die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD 86 sowie MHCII auf der Zelloberfläche.

Die Analyse der MFI zeigt, dass die Gesamtpopulation der pDC eine geringe Expression des Aktivierungsmarkers CD86 aufweist, unter Infektionsbedingungen erhöht es sich geringfügig. Analysiert man die DC Gesamtpopulation bezogen auf die vier Subsets  $CD103^+$ DC,  $CD11b^{hi}$ DC,  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$  und pDC, so werden deutliche Unterschiede sichtbar.

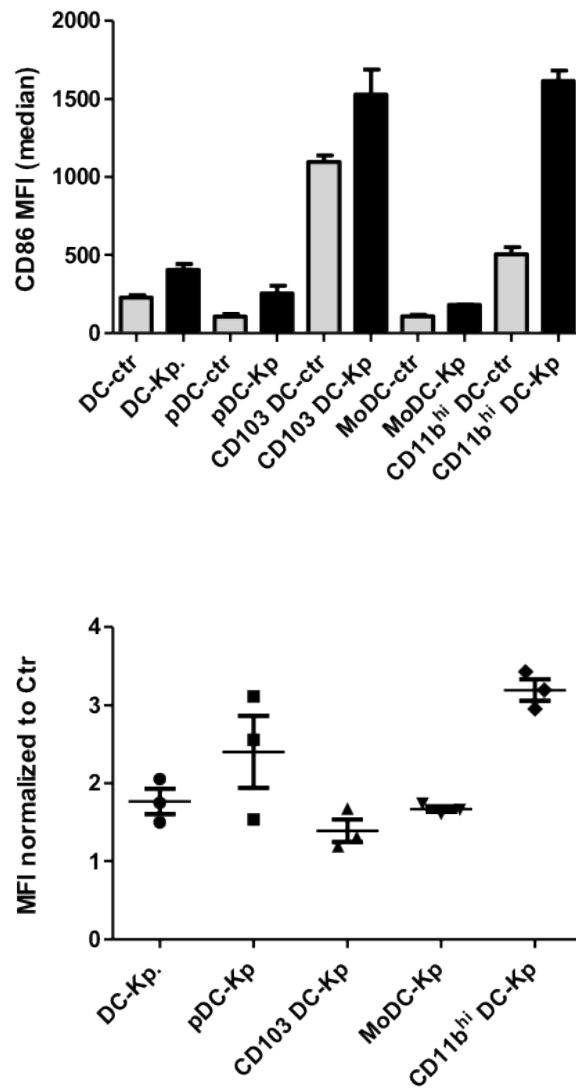


**Abbildung 3.4.1:** CD4 T-Zellproliferation nach Stimulation mit OVA durch verschiedene DC-Subpopulationen verglichen mit Kontrollen ohne OVA bzw. ohne Zugabe von DC ( $n \geq 3$ ); B: Anteil proliferierender CD4-T-Zellen nach Stimulation mit OVA und verschiedenen DC-Subpopulationen, Makrophagen und Granulozyten (interne Kontrollen) im Vergleich mit Kontrollen ohne OVA bzw. ohne Zugabe von DC ( $n \geq 3$ ); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; MoDC bezeichnet hier Zellen des Phänotyps  $CD11b^+MHCII^{neg/low}$ .

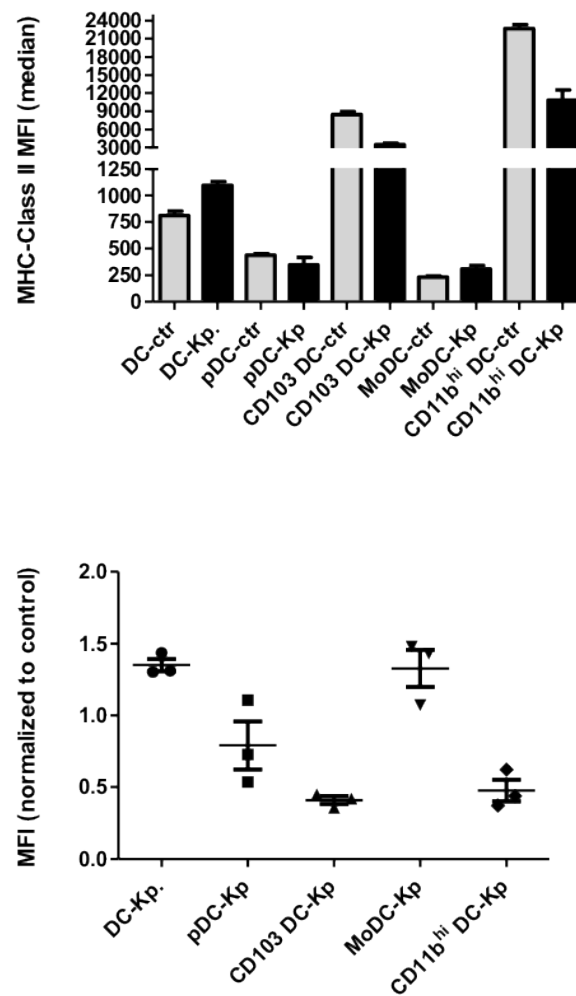
Am stärksten wird CD86 von  $CD103^+$  exprimiert wird und sich dies unter Infektionsbedingungen verstärkt.  $CD11b^{hi}$ DC zeigen in dieser Darstellung eine durchschnittliche Expression von CD86, die sich aber unter Infektionsbedingungen stark erhöht und das Niveau der  $CD103^+$ DC erreicht. Sowohl pDC als auch  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$  exprimieren kaum CD86.

Hinsichtlich des Reifungsmarkers MHCII zeigt sich bezogen auf die Gesamtpopulation der DC eine durchschnittliche Expression. Werden die Subsets diskriminiert, zeigt sich, dass  $CD103^+$ DC und  $CD11b^{hi}$ DC das höchste Ausgangsniveau an MHCII Expression zeigen. Die MHCII Expression wird unter Infektionsbedingungen schlechter.  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$  und pDC zeigen kaum MHCII auf ihrer Oberfläche. Dies verändert

sich unter Infektionsbedingungen nicht.



**Abbildung 3.5.1:** Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsmarkers CD86 auf der Oberfläche definierter respiratorischer DC-Subpopulationen in Klebsiella-infizierten C57BL6/N Mäusen sowie in nicht-infizierten Kontrolltieren. Gemessen wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf der Zelloberfläche ( $n \geq 3$ ); MFI = Mean Fluorescence Intensity; MoDC bezeichnet hier Zellen des Phänotyps  $CD11b^{+}MHCII^{neg/low}$ .



**Abbildung 3.5.2:** Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsmarkers MHCII auf der Oberfläche definierter respiratorischer DC-Subpopulationen in Klebsiella-infizierten C57BL6/N Mäusen sowie in nicht-infizierten Kontrolltieren. Gemessen wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf der Zelloberfläche (n ≥ 3); MFI = Mean Fluorescence Intensity; MoDC bezeichnet hier Zellen des Phänotyps CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup>.

### 3.6 Charakterisierung der Zytokinexpression respiratorischer Leukozyten nach Behandlung mit dem TLR7 Liganden Imiquimod und folgender Stimulation durch *Klebsiella pneumoniae*

#### 3.6.1 Allgemeines

Imiquimod ist ein synthetischer TLR 7 Ligand und wird als Creme kutan appliziert. Der Wirkstoff stimuliert antivirale und antitumorale Antworten des innate und adaptiven Immunsystems (Miller et al., 2008; Smits et al., 2008). Das Medikament dient zur Behandlung von aktinischer Keratose, oberflächlichen Basalzellkarzinomen und Genitalwarzen (Wagstaff et al., 2007; Gaspari et al., 2009). Im Rahmen der Arbeit von Frau Nicole Haggel, welche die Effekte dieses TLR7 Liganden auf die einzelnen Immunzellpopulationen untersuchte, wurde in einer Kooperation der Effekt von *Klebsiella pneumoniae* auf die Zytokinproduktion in diesem System untersucht.

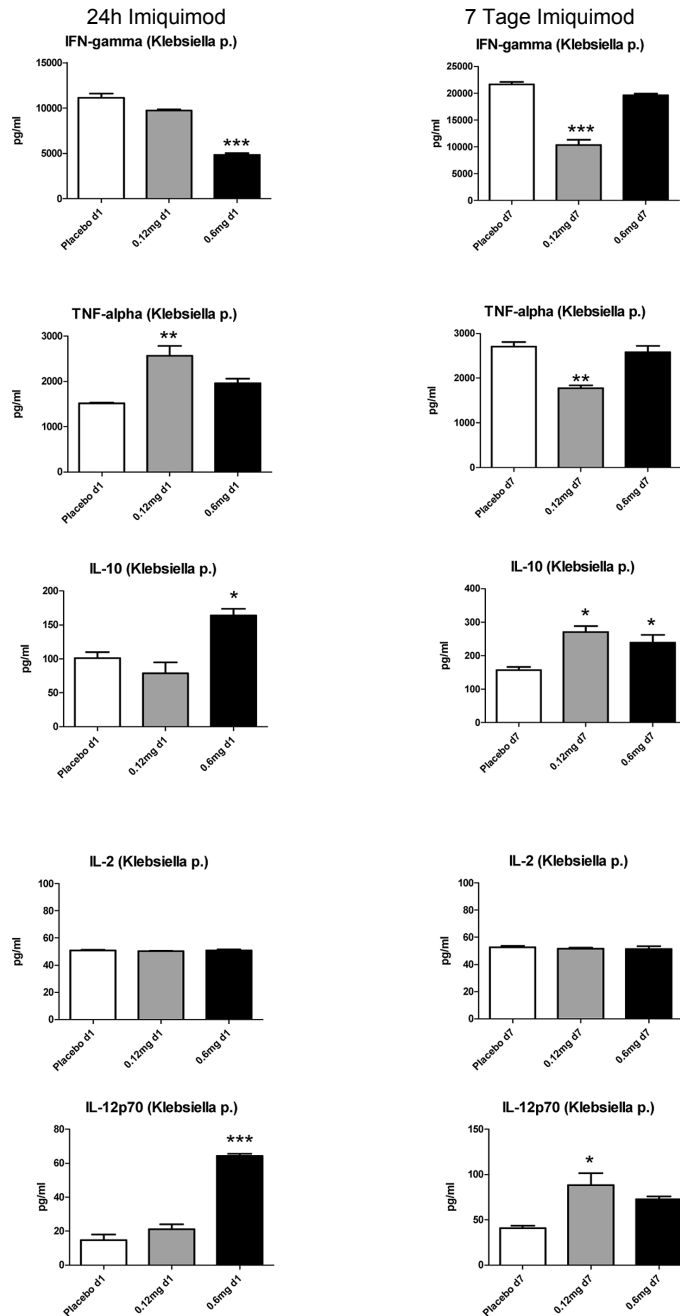
#### 3.6.2 Expression von Interferon-gamma, TNF-alpha, Interleukin-10, Interleukin-2 und Interleukin-12p70 unter dem Einfluss von Imiquimod und Klebsiella-Lysat

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zytokinproduktion unter Infektionsbedingungen von einem TLR7 Liganden moduliert werden kann. Die Interferon-gamma Produktion wird unter dem Einfluss von Imiquimod nach 24h signifikant reduziert. Hierbei wirkt die Kombination aus kurzer Therapie mit der höheren Dosis des Medikaments ähnlich stark wie eine länger Behandlung mit geringerer Dosis.

Die TNF-alpha Produktion ist unter Imiquimod Stimulation signifikant erhöht bei kurzer Behandlungsdauer mit niedriger Dosis. Die Menge des synthetisierten Zytokins fällt aber deutlich ab bei Langzeiteinwirkung.

Leicht erhöht ist die Interleukin-10 Synthese nach 24h Behandlung mit der größeren Dosis Imiquimod. Durch Langzeitbehandlung wird mehr des Zytokins produziert, sowohl bei geringerer als auch höherer Dosis. Unter Einwirkung von der größeren Dosis Imiquimod für 24h erhöht sich die Produktion von Interleukin-12p70 signifikant. Dieser Effekt ist schwächer bei längerer Behandlung mit der niedrigeren Dosis des TLR7-Liganden.





**Abbildung 3.6.1:** Untersuchung von Leukozyten aus 24h und 7 Tagen mit zwei verschiedenen Dosierungen Imiquimod behandelten C57BL/6/N Mäusen mittels CBA. Dargestellt ist die Produktion von Interferon-gamma, TNF-alpha, Interleukin-10, Interleukin-2 und Interleukin-12p70 nach in vitro Stimulation mit Klebsiella-Lysat; n ≥ 3.



# 4

## Diskussion

### 4.1 Heterogenität der respiratorischen leukozytären Subpopulationen und DC-Subsets in Inzucht-Mausstämmen

Mausmodelle sind für die Erforschung von Krankheitsbildern, möglichen Therapieansätzen und Grundlagenforschung nach wie vor unverzichtbar. Verwendung finden hier unterschiedliche Inzuchtstämme, die den genetischen Hintergrund für unterschiedlichste transgene Modelle bilden. Speziell für Untersuchungen immunologischer Prozesse in diesen Modellen ist es von großer Wichtigkeit, das Versuchstier passend zum Versuch auszuwählen. Meist sollen die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein. Hier muss sich der Untersucher bewusst sein, dass unter Umständen genetische Unterschiede zwischen den verfügbaren Mausmodellen gibt, die das Ergebnis maßgeblich beeinflussen können (Lam-Yuk-Tseung and Gros 2003). In einem Modell von chemisch induziertem Asthma lässt sich dieser Effekt ebenfalls beobachten (Vooght et al. 2010). Auch für die Abwehr von Infektionen spielt der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle, immunologisch relevante Gene sind durch die Arbeit mit Inzuchtstämmen identifiziert worden (Gruenheid and Gros 2010). In Infektionsversuchen sind gerade die Stamm-Unterschiede zu berücksichtigen, welche die Anzahl bestimmter Immunzelltypen betrifft, da sie die natürliche Resistenz oder Anfälligkeit gegen ein Pathogen bestimmen. Dafür gibt es zahlreiche Belege in der Literatur. So sind DBA-Mäuse besonders anfällig für Lungen-Tuberkulose, wohingegen 129Sv sich Tiere sehr resistent gegen *S.typhimurium* zeigten (Lam-Yuk-Tseung and Gros 2003). Hinsichtlich chronischer *P.aeruginosa* Infektion erwiesen sich BALB/c

Mäuse als sehr resistent, wohingegen Tiere des DBA-Stammes hochanfällig sind (Stotland et al. 2000). Im Pneumovirus-Modell sind der DBA- wie auch 129Sv-Stamm wesentlich empfindlicher als BALB/c und C57BL6/N (Anh et al. 2006), Darüber hinaus ist es unverzichtbar, den Normalwerte des Versuchstiers zu kennen, um Untersuchungsergebnisse in den richtigen Zusammenhang zu bringen. Für die Gewinnung von einzelnen, aufgereinigten Immunzellpopulationen bietet es sich an, Tiere zu nutzen, die bereits natürlich möglichst viele dieser Zellen besitzen. Dies reduziert den Tierverbrauch maßgeblich.

Für die Untersuchung genereller inflammatorischer Prozesse gilt das Gleiche, da auch dies abhängig vom Ausgangszustand des untersuchten Modells ist. So gibt es dokumentierte Unterschiede in einer Studie über die Wirkung von Ozon auf die Atemwege, bei der sich C57BL6/N als wesentlich empfindlicher als C3H Mäuse zeigten (Broeckert et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit stellt verschiedene im nicht-infizierten Zustand vorkommenden respiratorische Zellpopulationen des Immunsystems unterschiedlicher Inzuchtstämme gegenüber und zeigt wesentliche Unterschiede zwischen ihnen auf. Bisher liegen dazu keine umfassenden Daten in der Literatur vor. Für weitere Arbeiten stellen diese Ergebnisse Referenzwerte zur Verfügung und könnten die Korrelation mit bestimmten Befunden vereinfachen.

#### 4.1.1 Heterogenität der respiratorischen DC-Subpopulationen

Beim Vergleich von vier definierten respiratorischen DC-Subsets sind starke quantitative Unterschiede zwischen den Inzuchtstämmen messbar, obwohl die Quantität der Gesamt-DC in den Inzuchtstämmen vergleichbar ist.

129Sv Mäuse zeigen eine vielfach höhere natürliche Zahl von pDCs in der Lunge als alle anderen Stämme. Bei Experimenten, welche die Aufreinigung von pDC aus Mäusen erfordern, würde dieser Inzuchtstamm sich am besten eignen, um Tierzahlen und Experimentalzeit zu reduzieren.

Die hohe Zahl von pDC in diesem Mausstamm ist in der Literatur bereits dokumentiert. Asselin-Paturel et al. sowie Nakano et al. stellen ebenfalls eine signifikant erhöhte Frequenz dieses DC-Subsets in der Milz und dem Blut von 129Sv Mäusen fest. Da pDC maßgeblich den Verlauf viraler Infektionen beeinflussen und für die Immunregulation von großer Bedeutung sind, beeinflussen höhere Anzahlen dieser DC die Pathogenese von respiratorischen Allergien und viralen Atemwegserkrankungen.

CD103<sup>+</sup>DC kommen in C3H Mäusen in signifikant höherer Anzahl als in anderen Inzuchtstämmen, besonders verglichen mit 129Sv und DBA Mäusen. Diese DC-Subpopulation ist essentiell für die Aktivierung naiver CD8<sup>+</sup> Killerzellen in viralen Atemwegserkrankungen (Beauchamp et al. 2010; Kim and Braciale 2009). Veränderte Anzahlen der CD103<sup>+</sup>DC modulieren möglicherweise die unterschiedliche Ausprägung der antiviralen Immunantwort in verschiedenen Inzuchtstämmen und somit die Pathogenese pulmonaler

Erkrankungen.

Auch hinsichtlich der Population der  $CD11b^{+}MHCII^{neg/low}$  zeigte sich ein Mausstamm als besonders reich an diesem Subset. C3H Mäuse besitzen im gesunden Zustand deutlich mehr dieser Zellen als DBA, BALB/c und C57BL6/N Tiere. Da die  $CD11b^{+}MHCII^{neg/low}$  jedoch wenig effizient hinsichtlich der Antigenpräsentation an naive T-Zellen sind (Kim and Braciale 2009) und möglicherweise die Vorläufer der  $CD11b^{hi}MHCII^{hi}$  DC darstellen (eigene Ergebnisse), ist schwer einzuschätzen, inwieweit ihre Zahl virale und bakterielle Atemwegserkrankungen beeinflusst.

$CD11b^{hi}MHCII^{hi}$  DC sind am stärksten in 129Sv Mäusen vertreten, besonders deutlich im Vergleich mit dem C3H Stamm. In Influenza-Infektionen gelten diese Zellen als potente Aktivatoren naiver  $CD4^{+}$  T-Zellen (Kim and Braciale 2009). Da C57BL6 und BALB/c für Infektionen der Lunge die am häufigsten gebrauchten Inzuchtstämme sind, ist in der Literatur über die 129Sv Tiere und die Pathogenese viraler Atemwegsinfektionen kaum etwas bekannt.

#### 4.1.2 Heterogenität der Granulozyten

Signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Inzuchtstämmen zeigen die Granulozyten. Die Anzahl der Eosinophilen bei BALB/c Mäusen im Vergleich zu C3H und C57BL6/N deutlich höher. In der Literatur finden sich keine Angaben zur Anzahl Eosinophiler im gesunden Zustand, jedoch in Modellen von infektiösen und nicht infektiösen Lungenerkrankungen. So berichtet die Arbeit von Zhu and Gilmour 2009, dass im Allergie-Modell nach Sensibilisierung mit OVA C57BL6/N Mäuse mit einer schwächeren Erhöhung der Eosinophilen reagieren als BALB/c.

Die natürliche Anzahl Neutrophiler in der BAL von Inzuchtmausstämmen ist in C3H und DBA Mäusen höher, am deutlichsten im Vergleich mit 129Sv Tieren. Dies ist in der Literatur, die Inzuchtstamm-Vergleiche beinhaltet, so noch nicht beschrieben.

Innerhalb der Makrophagen zeigten die verschiedenen Inzucht-Mausstämme keine großen quantitativen Unterschiede. Bei der Betrachtung der Ergebnisse und Abgleich mit dem aktuellen Wissensstand muss jedoch beachtet werden, dass quantitativen Unterschieden zwar wichtige Informationen liefern, aber auch qualitative Unterschiede bestehen können. Dies wird unter anderem deutlich am Beispiel einer Studie von Sung et al. 2006, in der die Sensitivität von C57BL6 und 129Sv Mäusen auf eine Infektion mit Pneumokokken untersucht wurde. Hier erwiesen sich 129Sv Tiere als deutlich anfälliger, da ihre Alveolarmakrophagen die Erreger schlechter phagozytieren konnten als die Alveolarmakrophagen der C57BL6 Tiere.

#### 4.1.3 Heterogenität der respiratorischen Lymphozyten

Hinsichtlich aller untersuchter Leukozyten-Populationen ergab sich zwischen den Inzuchtstämmen eine mehr oder weniger ausgeprägte Heterogenität.

Hier zeigen C57BL6/N Mäuse sich reich an B-Zellen und T-Killerzellen, besitzen aber kaum  $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD90}^{\text{neg}}$  Leukozyten.

Der Stamm BALB/c zeigt einen verhältnismäßig hohen Anteil an Gesamt-T-Zellen, T-Helferzellen und  $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD90}^+$  Leukozyten. Besonders BALB/c sind daher eine gute Wahl für die Untersuchung dieser Immunzell-Subpopulation, die seit kurzem unter der Bezeichnung ‚Nuozyten‘ vermehrt in der Literatur auftaucht (Neill and McKenzie 2011; Neill et al. 2010). Der Stamm C3H zeichnet sich aus durch besonders viele  $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD90}^{\text{neg}}$  Leukozyten sowie eine hohe Anzahl an NK-Zellen. DBA-Mäuse besitzen grundsätzlich durchschnittliche Zahlen der untersuchten Immunzellen, lediglich  $\gamma\delta$  T-Zellen sind in diesem Stamm quantitativ deutlich häufiger als in C57BL6/N und BALB/c Mäusen, weshalb sich diese Mäuse besonders gut für die Gewinnung dieser T-Zellpopulation eignen könnten.

Genauer wurde die Population der regulatorischen T-Zellen in der vorliegenden Arbeit analysiert. Regulatorische T-Zellen sind unverzichtbarer Bestandteil des Immunsystems, da sie dafür sorgen, dass immunologische Reaktionen nicht zu stark werden und sich damit gegen den eigenen Organismus richten. Darüber hinaus vermitteln sie Toleranz und verhindern im Idealfall damit Autoimmunerkrankungen. Somit ist ihre Funktion anders definiert als die anderer Zellpopulationen, sie tragen jedoch maßgeblich zur Feinmodulation jeder Immunantwort bei.

Auch innerhalb dieser Population zeigen sich deutliche, stammabhängige Unterschiede zwischen den verschiedenen Inzuchtmäusen. BALB/c und 129Sv zeigten signifikant höhere respiratorische Treg Anzahlen als C3H und DBA Tiere. C57BL6/N Mäuse besitzen eine große Anzahl von  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}$  sowie  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{Foxp3}^+$  Tregs, wenige  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{hi}}\text{Foxp3}^+\text{CD39}^+$  Tregs und eine mittlere Anzahl von  $\text{CD4}^+\text{CD27}^{\text{neg/low}}\text{CD25}^+$  Zellen. Funktionell ist zu den stammspezifischen Unterschieden in Verbindung mit regulatorischen T-Zellen praktisch nichts bekannt. Weiterführende Studien sind nötig, um festzustellen, ob und wie stark sich dies in unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen auswirkt.

#### 4.1.4 Funktionelle Unterschiede respiratorischer Leukozyten nach T-Zell- sowie nach TLR4- und TLR7- Aktivierung

Nicht nur die rein zahlenmäßigen Unterschiede der Immunzellpopulationen spielen für Versuchsreihen eine Rolle, sondern auch deren qualitative Eigenschaften. Eine der wichtigsten Funktionen von Immunzellen, außer der direkten Abwehr eines Pathogens, ist, durch Zytokine und Chemokine Signale zu übermitteln. So werden Zellen zum Infekti-

onsort hin oder von ihm fort dirigiert und ermöglichen so das komplexe Zusammenspiel von innatem und adaptivem Immunsystem.

Die respiratorischen Leukozyten von BALB/c Mäusen zeigen in der vorliegenden Arbeit durchgehend das größte Potential zur TNF-alpha Produktion nach Stimulation durch LPS und CD3/28.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeit von Gosselin et al. 1995, die gezeigt hat, dass die Resistenz der BALB/c Mäuse gegen Infektionen mit *P.aeruginosa* auf starke TNF-alpha Produktion zurückzuführen ist.

Außerdem zeigen BALB/c Mäuse ein etwas größeres Potential zur Produktion von IL-10 nach T-Zellstimulation als die anderen Inzuchtstämme. Auf mRNA-Ebene konnte dies für den Stamm in einer Infektion mit *M.pulmonis* ebenfalls gezeigt werden (Sung et al. 2006). Die Arbeitsgruppe stellte auch einen Anstieg der mRNA für IL-10 in C3H Mäusen fest, dieses Ergebnis lässt sich jedoch bisher auf Proteinebene nicht bestätigen.

Im Infektionsmodell mit dem Pilz *C.immitis* wurde festgestellt, dass höhere Produktion von IL-10 mit einer erhöhten Anfälligkeit von Inzuchtmausstämmen einhergeht und BALB/c wie C57BL6/N Mäuse im Rahmen einer Th2 Antwort mehr von diesem Zytokin produzieren (Fierer et al. 1998). Für Infektionen mit *Klebsiella pneumoniae* ist bekannt, dass höhere IL-10 Spiegel mit einer erhöhten Sterblichkeit und einem schwereren Verlauf der Erkrankung verbunden sind (Greenberger et al. 1995; Soares et al. 2003; Standiford et al. 1996; Wang et al. 2001).

## 4.2 Heterogenität respiratorischer DC in der experimentellen *Klebsiella*-Pneumonie von C57BL6/N Mäusen

Die durch *Klebsiella pneumoniae* hervorgerufene Infektion der Lunge ist ein Standardmodell für die gram-negative Pneumonie. Dennoch ist diese Infektion in Tiermodellen bisher weder klinisch noch immunologisch genau charakterisiert. Dies könnte jedoch Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Behandlungsansätze darstellen. Durch die immer häufiger werdenden Antibiotika-Resistenzen im Krankenhausumfeld ist die Forschung auf diesem Gebiet essentiell.

Grob verallgemeinert erfolgt die immunologische Antwort durch Zellwanderung zum Infektionsort hin oder von ihm fort, durch Regulation löslicher Mediatoren sowie daraus resultierende Gewebeveränderungen. In Kombination mit dem zeitlichen Verlauf ergibt sich eine hohe Komplexität der Erkrankung.

Die quantitativen Veränderungen leukozytärer Subpopulationen im Vergleich und über den Verlauf der *Klebsiella*-Pneumonie von akuter bis hinein in die postakute Phase sind nicht eingehender charakterisiert, darunter ebenfalls die respiratorischen DC. Eine deutlich differenzierte Rolle einzelner DC-Subpopulationen im und auf den Verlauf dieser pulmonalen Infektion wurde bisher noch nicht angenommen, da die DC weitgehend als

relativ homogene Gruppe wahrgenommen werden.

Betrachtet man die DC in der vorliegenden Arbeit ebenfalls so, wird auf rein quantitativer Ebene zunächst eine deutliche Erhöhung der Gesamtzahl Dendritischer Zellen unter Infektionsbedingungen deutlich. Dies ist erwartetes Ergebnis vor dem Hintergrund der ablaufenden Immunantwort. Bei Bakterienkontakt in der Präsenz von inflammatorischen Zytokinen wie GM-CSF differenzieren Monozyten im Menschen zu dendritischen Zellen (Romani et al. 1994; Sallusto and Lanzavecchia 1994). Für das murine Modell ist ebenfalls bekannt, dass Monozyten aus dem Blut zum Infektionsort hinwandern. Sie differenzieren dort in DC (Jakubzick et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamtpopulation der DC weiter differenziert, denn betrachtet man die DC als Gesamtpopulation und behandelt sie auch in experimentellen Ansätzen als einheitliche Gruppe, werden die Charakteristik und die differenzierte funktionelle Rolle einzelner DC-Subsets nicht sichtbar.

In der vorliegenden Arbeit ergibt sich bei Betrachtung der vier Subpopulationen der  $CD11c^+CD11b^+MHCII^{neg/low}$ ,  $CD11b^{hi}$ DC,  $CD103^+$ DC und pDC ein differenzierteres Bild, das zeigt, wieso eine Betrachtung der DC als Gesamtpopulation wenig aussagekräftig ist. Hierbei zeigt sich die Zahl der  $CD103^+$ DC sowie die  $CD11b^{hi}$ DC in der postakuten Phase am Tag 5 als besonders hoch. Die Immunantwort des erkrankten Tieres erreicht dort ihre volle Ausprägung.

In der Literatur wird die Subpopulation der  $CD11b^{hi}$ DC in den meisten Arbeiten ohne weitere Unterteilung behandelt (reviewed in Condon et al., 2011). Die Migration von  $CD11b^{hi}$ DC erfolgt CCR2-abhängig, ist jedoch bisher in Infektionen mit *L.monocytogenes*, *M.tuberculosis*, *T.gondii* und *C.neoformans* untersucht (Serbina et al. 2008). Für Infektionen mit *Klebsiella* liegen in der Literatur keine Daten vor. Zusammen mit den  $CD103^+$ DC werden sie als die Gruppe angesehen, die Antigen zu den drainierenden Lymphknoten transportiert und dort präsentiert. Für  $CD103^+$ DC wurde experimentell durch verschiedene Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass sie im Lymphknoten den dort residenten CD8alpha DC Antigen übergeben, was die CD8 T-Zellantwort verstärkt (Allan et al. 2006; Carbone et al. 2004). Darüber hinaus scheinen  $CD103^+$ DC besonders Material apoptotischer Zellen aufzunehmen und zu präsentieren (Desch et al. 2011). Auch für die Immunantwort gegen virale Infektionen wurde gezeigt, dass die  $CD103^+$ DC entscheidend sind, da sie am effektivsten CD8 T-Zellen aktivieren, wohingegen  $CD11b^{hi}$ DC trotz starker Antigenaufnahme eher am Infektionsort verbleiben und dort inflammatorische Zytokine produzieren (Ho et al. 2011). Die  $CD103^+$ DC sowie die  $CD11b^{hi}$ DC als migratorische DC scheinen die zentralen Populationen für die Antigenpräsentation im Lymphknoten zu sein.

Als unerwartetes Ergebnis zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein starker quantitativer Anstieg pDC am Tag 5 nach Infektion mit *Klebsiella pneumoniae*. Eine derartige Kinetik der pDC konnte in der Literatur bisher so für die gram-negative Pneumonie nicht gezeigt werden. Diese Population ist viel stärker im Zusammenhang mit viralen Infektio-



nen und verschiedenen Lungenerkrankungen im Menschen studiert worden (Zusammenfassung in von Garnier and Nicod 2009). Für dieses Subset wurde auch eine antivirale Aktivität bei Infektionen mit Influenza angenommen, es wird jedoch inzwischen kontrovers diskutiert, ob hier tatsächlich die pDC eine herausragende Rolle spielen (reviewed in Lambrecht and Hammad 2012). In anderen viralen Infektionsmodellen ist ihre funktionelle Beteiligung jedoch klar gezeigt worden (Swiecki et al. 2010). In der Literatur werden pDC dabei als ineffektiv bei Aufnahme und Präsentation von Antigen angesehen, können jedoch auch Toleranz induzieren und die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen fördern. Dies bremst den Entzündungsprozess und kann die Wiederherstellung des physiologischen Gleichgewichts in der Lunge fördern (Matta et al. 2010). Darüber hinaus ist erst kürzlich entdeckt worden, dass pDC unter dem Einfluss von TGF-beta eine Th17-Antwort fördern, was auch für die Beurteilung bakterieller Pneumonien ein interessanter Ansatzpunkt ist (Bonnefoy et al. 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass es bei durchflusszytometrischen Färbungen zu unspezifischen Färbungen und ähnlichen Artefakten kommen kann, wurde in der vorliegenden Arbeit diese kritische Überprüfung mit Hilfe der Marker mPDCA-1 und SiglecH hinsichtlich der pDC durchgeführt (Blasius and Colonna 2006; Sung et al. 2006). Die Analyse zeigt, dass fast 100% des Subsets ebenfalls für mPDCA-1 sowie für SiglecH positiv ist.

Die pDC trugen lange Zeit den Namen ‚natürliche Interferon-alpha produzierende Zellen‘, da sie zuerst durch diese spezielle Eigenschaft im Menschen entdeckt wurden (reviewed in Fitzgerald-Bocarsly 1993). Diese Fähigkeit muss daher ebenfalls bei pDC nachweisbar sein. Um die Fähigkeit der pDC zur IFN-alpha Produktion zu überprüfen, erfolgte eine Messung dieses Zytokins nach entsprechender Stimulation. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigen, dass es sich um pDC handelt. Die durchflusszytometrische Ebenso sind die pDC in der Lage, IFN-alpha in großen Mengen zu produzieren. Die internen Kontrollen sichern die Ergebnisse zusätzlich ab.

#### 4.2.1 Expression der Aktivierungsmoleküle CD86 und MHCII auf definierten respiratorischen DC-Subpopulationen

Um die unterschiedlichen Subpopulationen von pulmonalen DC hinsichtlich ihrer Effektivität zur T-Zell-Aktivierung besser einschätzen zu können, wurden die kostimulatorischen Moleküle CD86 und MHCII in der *Klebsiella pneumoniae* induzierten Pneumonie gemessen. Deutlich unterschieden werden muss in der vorliegenden Arbeit zwischen den Ergebnissen für die Gesamtpopulation der DC und den Ergebnissen für die einzelnen Subsets.

Die die durchflusszytometrische Messung des Oberflächenmoleküls CD86 in der Gesamtpopulation der DC zeigt ein niedriges Expressionsniveau mit einem leichten Anstieg unter Infektionsbedingungen. Es ist eine mittlere Expression von MHCII im gesunden Tier zu messen, unter Infektionsbedingungen kann man einen leichten Anstieg beobachten.

Aus der Literatur ist für die DC bekannt, dass MHCII und CD86 nur in geringem Maß bei unreifen Dendritischen Zellen gemessen werden, ein hohes Expressionslevel von MHCII Molekülen charakterisiert erst die reifen DC (Abbas and Lichtman 2005; Rink et al. 2011). CD86 wird in der Literatur als Molekül auf antigenpräsentierenden Zellen beschrieben, das T-Zellen über Interaktion mit CD28 und CTLA-4 ein kostimulatorisches Signal übermittelt, so dass sie aktiviert werden und zu proliferieren beginnen (Rink et al. 2011). Es ist ein unerwartetes Ergebnis, dass CD86 und MHCII auf den DC auch unter Infektionsbedingungen nicht besonders stark exprimiert sind. Bei einer deutlich ausgeprägten Pneumonie wäre zu vermuten, dass starke Expressionsanstiege der Moleküle zu messen sind.

Durch die vorgenommene Differenzierung der DC in Subpopulationen zeigt sich, dass diese sehr jedoch heterogen sind und sich der in der vorliegenden Arbeit gemessene Gesamteffekt aus der Summe der Reaktionen dieser Subsets ergibt.

CD103<sup>+</sup>DC sind im gesunden Tier die Gruppe der DC, welche am meisten CD86 auf ihrer Oberfläche tragen. Während der Infektion steigt die Expression noch einmal an. CD86 ist auf der Gruppe der CD11b<sup>hi</sup>DC etwas geringer exprimiert als bei den CD103<sup>+</sup>DC, erreicht jedoch unter Infektionsbedingungen ein mit den CD103<sup>+</sup> vergleichbares Niveau.

In der Literatur werden die CD103<sup>+</sup>DC als die vornehmlich auswandernde DC-Subpopulation betrachtet, das effektiv im Lymphknoten T-Zellen aktiviert (Allan et al. 2006; Carbone et al. 2004), gefolgt von den CD11b<sup>hi</sup>DC. Um dies erfolgreich zu tun, benötigen sie unter anderem eine hohe Dichte von CD86 auf ihrer Oberfläche. Die starke Expression, die in der vorliegenden Arbeit innerhalb dieser beiden Subsets gemessen wurde, zeigt ihre deutliche Reaktion während der experimentellen Klebsiella Pneumonie.

Die CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> Zellen zeigen sehr wenig CD86 Expression im nicht-infizierten Zustand, es ist keine große Veränderung in der Klebsiella-Pneumonie zu sehen. Die CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> Zellen stellen sich als nicht reaktive DC-Subpopulation dar, das kaum mit kostimulatorischen Molekülen ausgestattet ist.

pDC zeigen im gesunden Tier ein ähnlich niedriges Niveau an CD86 Molekülen auf ihrer Oberfläche. Auch unter Infektionsbedingungen verstärkt sich die Expression dieses Moleküls kaum. Dies unterstützt die Annahme, dass diese Zellpopulation der CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> Zellen und die pDC möglicherweise eine geringere Bedeutung für die Kostimulation von T-Zellen haben.

Die Analyse von MHCII zeigt auf der Oberfläche der CD11b<sup>hi</sup>DC die größte Menge von MHCII-Molekülen im Vergleich mit den anderen DC-Subsets. Da CD11b<sup>hi</sup>DC bereits in der initialen FACS-Analyse über ihre hohe Expression von MHCII definiert sind, ist dies ein klar zu erwartendes Ergebnis. Unter Infektionsbedingungen sinkt die Menge von MHCII auf der Oberfläche dieser DC Population ab.

Die CD103<sup>+</sup>DC zeigten etwas geringere Mengen an MHCII Molekülen auf der Oberfläche als die Gruppe der CD11b<sup>hi</sup>DC. Unter Infektionsbedingungen sinkt die Menge von

MHCII.

Dies könnte darauf hindeuten, dass die stark aktivierten Zellen dieses Subsets ausgewandert sind. Sie könnten ihre endgültige Ausreifung und die Erhöhung der MHCII Expression auch erst auf dem Weg in den nächsten Lymphknoten erfahren. Daher ist eine starke MHCII-Dichte auf der Oberfläche der am Infektionsort verbliebenen CD103<sup>+</sup> und CD11b<sup>hi</sup>DC nicht unbedingt zu erwarten. Eventuell gehen auch einige DC nach Aktivierung am Infektionsort bereits in Apoptose über.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Erreger direkt oder indirekt die Expression von MHCII auf DCs herunter reguliert. Für eine experimentelle Infektion mit *Francisella tularensis* gibt es Daten, die zeigen, dass MHCII in DC der Lunge trotz Infektion nicht hochreguliert werden (Bosio et al. 2007; Hunt et al. 2012). Auch bei Infektion mit *Yersinia enterocolitica* im Darm ist eine Reduktion der MHCII Expression auf DC zu beobachten (Schoppet et al. 2000).

Die Zellpopulation mit dem geringsten Vorkommen von MHCII auf der Oberfläche sind die CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> Zellen. Es gibt kaum Unterschiede zwischen Kontrolle und Infektion. Die Expression von MHCII auf pDC bewegt sich auf einem ähnlichen Niveau. Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls, dass diese Zellpopulation nur eine geringe Bedeutung für die Kostimulation von T-Zellen haben.

#### 4.2.2 Respiratorischen DC-Subpopulationen zeigen stark heterogenes Potential zur Aktivierung und Proliferationsinduktion von T-Helferzellen

Eine weitere zentrale Fähigkeit der DC besteht darin, T-Zellen mit zum präsentierten Antigen passendem T-Zellrezeptor zu aktivieren und damit zur Teilung anzuregen.

Um das aktivierende Potential der respiratorischen DC zu untersuchen, wurde im transgenen Modell der T-Zellproliferation jedes definierte Subset getrennt untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt unabhängig vom migratorischen Potential der DC-Subpopulation starke Unterschiede in ihrer Fähigkeit, die T-Zellen zur Teilung anzuregen. Das höchste aktivierende Potential ergibt sich für CD11b<sup>hi</sup> und CD103<sup>+</sup>DC, wobei die CD103<sup>+</sup>DC die stärkste Proliferation induzierten.

Es gibt einige Arbeiten, die zeigen, dass die DC-Subpopulationen unterschiedlich stark die Teilung bei T-Zellen initiieren – dabei spielt ihre Effizienz beim Auswandern in den Lymphknoten auswandern eine große Rolle, etwa bei den CD103<sup>+</sup>DC (Allan et al. 2006; Carbone et al. 2004). Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass die CD103<sup>+</sup>DC das vornehmlich auswandernde Subset darstellt, dass effektiv im Lymphknoten T-Zellen aktiviert (Allan et al. 2006; Carbone et al. 2004).

Die CD11b<sup>hi</sup>DC werden von Kim and Braciale 2009 wie die CD103<sup>+</sup>DC in drainierenden Lymphknoten gefunden, allerdings in einer experimentellen Virusinfektion. Die Population der CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHCII<sup>neg/low</sup> Zellen scheint dagegen nicht fähig zur Stimulation von T-Zellen, ebenso wie die pDC, welche sich generell stark von den anderen

respiratorischen DC abgrenzen.

#### 4.2.3 Funktionelle Rolle der pDC in der gram-negativen Klebsiella-Pneumonie

Für die pDC sind verschiedene Aufgaben im Verlauf einer respiratorischen Inflammation denkbar, anders als die der ‚klassischen‘ DC, welche sich grob als Antigenaufnahme, Migration und Präsentation zusammenfassen lassen.

So könnten pDC an der Regulation der Immunantwort während der abklingenden Infektion maßgeblich beteiligt sein. pDC können theoretisch sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen aktivieren (Takagi et al. 2011), obwohl wir es in diesem Modell der gram-negativen Pneumonie zumindest für CD4-Helferzellen nicht zeigen konnten. Die Präsentation von Antigen durch pDC an Helferzellen scheint jedoch die Th1 und Th17 Immunantwort inhibieren zu können, was möglicherweise die Entstehung einer T-Helferzell-vermittelten Autoimmunität verhindert (Loschko et al. 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen allerdings die Unfähigkeit, in diesem experimentellen System T-Helferzellen zu stimulieren, was eine funktionelle Rolle im Schutz vor Autoimmunität unwahrscheinlich erscheinen lässt. Darüber hinaus wird durch mehrere Arbeitsgruppen hinsichtlich der Klebsiella-Pneumonie von einer Ausprägung einer Th17 Antwort berichtet (reviewed in Curtis and Way 2009), die laut Loschko et al. in ihren Versuchen inhibiert wird. Die Unfähigkeit zur Kostimulation von T-Helferzellen schließt allerdings nicht aus, dass die pDC generell auch inhibierend wirken könnten.

Da in der postakuten Phase einer Klebsiella-Infektion auch vermehrt regenerative Prozesse einsetzen, um den entstandenen Gewebeschaden zu beheben, ist auch eine Beteiligung der pDC an diesen Reparaturprozessen denkbar. So wird auch durch Gregorio et al berichtet, dass pDC 24h nach einer Hautverletzung in großer Zahl in den betroffenen Hautarealen akkumulieren. Die pDC werden durch die Freisetzung von Nukleinsäuren durch geschädigte Zellen zum Verletzungsort dirigiert, sie beeinflussen die Produktion von Th17 Zytokinen, die auch im Zusammenhang mit der *Klebsiella*-Pneumonie für die Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen (reviewed in Curtis and Way 2009). Die Depletion der pDC verzögert den Heilungsprozess des Hautepithels (Gregorio et al. 2010). Eine Rolle der pDC bei der Wiederherstellung geschädigten Lungenepithels ist denkbar. Um die Frage zu klären, welche funktionelle Bedeutung der starke Anstieg der pDC in der postakuten Phase hat, müssten jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### 4.3 Immunologische Modulation der Zytokinexpression respiratorischer Leukozyten nach Behandlung mit dem TLR7 Liganden Imiquimod während der *Klebsiella pneumoniae* Infektion

In der experimentellen *Klebsiella*-Pneumonie ist ebenfalls die Rolle verschiedener löslicher Immunmediatoren untersucht worden. In der Literatur haben sich schon früh TNF-alpha (Laichalk et al. 1996), IL-10 (Greenberger et al. 1995), MIP-1 und -2 (Greenberger et al. 1995; Standiford et al. 1996) sowie IL-12 (Bhan et al. 2010; Greenberger et al. 1996; Happel et al. 2005; Herold et al. 2011) als besonders bedeutend in der gram-negativen Pneumonie herauskristallisiert. Die herausragende Beteiligung von IL-17 an der Rekrutierung von Neutrophilen ist ebenfalls beschrieben und wird seit einigen Jahren eingehender untersucht (Review in Matsuzaki and Umemura 2007). Insgesamt stellt insbesondere die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen eine Grundlage für die erfolgreiche Resolution einer bakteriellen Pneumonie dar welche besonders bei einer Infektion von *Klebsiella pneumoniae* von entscheidender Bedeutung ist (Moore and Standiford 1998; Review in Schultz and van der Poll 2002).

Die Auswirkung bakterieller Stimulation auf die Zytokinproduktion respiratorischer Leukozyten ist generell wenig untersucht, im Fokus sind in den vorhandenen Arbeiten meist Interleukin-10 und TNF-alpha, jedoch nicht im Krankheitskontext gram-negativer Pneumonie. Besonders Interleukin-10 scheint im Zusammenhang mit der *Klebsiella*-Pneumonie sehr interessant, da die Gewebeschäden-induzierenden starken inflammatorischen Prozesse durch dieses Zytokin moduliert werden könnten. Eine Stimulation der Immunzellen während einer bakteriellen Infektion erfolgt zuerst über Mustererkennungsrezeptoren, zu denen auch die Gruppe der TLR (Toll-like Rezeptoren) gehört (Rink et al. 2011).

Für die vorliegende Arbeit wurde innerhalb dieser Kooperation ein TLR7 Ligand eingesetzt, um die Auswirkung auf die Zytokinproduktion der respiratorischen Leukozyten in der gram-negativen Pneumonie zu untersuchen. Es stellte sich nach Analyse der quantitativen Veränderungen respiratorischer Leukozyten in der *Klebsiella*-Pneumonie die Frage, ob sich die für die akute Infektion gezeigte Immunantwort modulieren lässt.

Hier konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Behandlungsdauer mit Imiquimod darüber die Immunantwort in der Infektion sehr unterschiedlich moduliert. Eine geringe Menge des Medikaments zeigt sich bereits als ausreichend, um Veränderungen in der Zytokinproduktion im Infektionsmodell zu erzeugen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten geben Hinweise, welche der untersuchten Zytokine durch die Anwesenheit von *Klebsiella pneumoniae* in vitro reguliert werden.

Bei Behandlung mit niedriger Dosis TLR7-Ligand wird über längere Zeit signifikant mehr immunsuppressives Interleukin-10 produziert. Interleukin-10 ist ein stark diskutierter Faktor hinsichtlich des Verlaufs der *Klebsiella* Pneumonie (Greenberger et al. 1995; Soares et al. 2003; Standiford et al. 1996; Wang et al. 2001), da er einerseits als antiin-

flammatorisches Zytokin den Verlauf der Krankheit positiv beeinflussen müsste, in einigen Arbeiten jedoch das Gegenteil gezeigt wird. Die Effekte von Interleukin-10 müssten in vivo näher untersucht werden, um neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise dieses Zytokins zu erlangen.

Eine höhere TNF-alpha Produktion trägt möglicherweise zu einem günstigeren Verlauf gram-negativer Pneumonien bei (Laichalk et al. 1996). Im Versuch ist der Spiegel dieses Zytokins nach Gabe einer kleineren Dosis Imiquimod für 24h deutlich erhöht. Eine längere Gabe des Therapeutikums bewirkt den gegenteiligen Effekt.

Für Interferon gamma ist aus der Literatur bekannt, dass lokale Produktion dieses Zytokins die Rekrutierung Neutrophiler unterstützt und so den Verlauf einer gram-negativen Pneumonie verbessert (Ruan et al. 2006). Unter Imiquimod Einfluss sinkt der Spiegel dieses Zytokins unterschiedlich stark.

Hinsichtlich der Zytokinproduktion von Interleukin-12p70 unter dem Einfluss von Klebsiella gibt es keine Vergleichsdaten. Somit ist die potentielle Wirkung dieser Zytokinveränderung schwer einzuschätzen. Imiquimod führt vor allem bei kurzer Gabe einer höheren Dosis zu einer vermehrten Produktion des pro-inflammatorischen Interleukin-12p70. Weiterführende Untersuchungen sind für eine Beurteilung der beobachteten Veränderungen der Zytokinexpression nötig, um die Effekte gewichten und in einen Gesamtzusammenhang setzen zu können.

Interessant wäre eine experimentelle Untersuchung des Beitrags der DC-Subpopulationen an der Veränderung der Zytokinproduktion in der Infektion mit Klebsiella pneumoniae.

Die bisher veröffentlichten Arbeiten schätzen die Expression von TLRs auf DC als organspezifisch unterschiedlich ein. Hinsichtlich ihrer TLR-Expression in der Lunge gibt es einige Untersuchungen der DC-Populationen (Zusammenfassung in Lambrecht and Hammad 2012). Hier ist mittlerweile über CD103<sup>+</sup>DC in der Lunge der Maus bekannt, dass diese hauptsächlich TLR3 sowie eine geringe Menge TLR4 im nicht-infizierten Zustand exprimieren (Desch et al. 2011). CD11b<sup>hi</sup>DC zeigen eine deutliche Expression von TLR2 und TLR7 (Desch et al. 2011), pDC tragen TLR7 und TLR9 auf ihrer Oberfläche (Gregorio et al. 2010; Kadowaki et al. 2001).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DC-Subsets auf kutane Applikation eines TLR7-Liganden mit quantitativen und qualitativen Veränderungen reagieren (Hackstein et al. 2012a). Experimentell geklärt werden müsste, inwieweit sich dieser Effekt unter Infektionsbedingungen manifestiert und sich auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt.

# Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Heterogenität und Modulation der respiratorischen Zellpopulationen unter nichtinfektiösen Bedingungen in Inzucht-Mausstämmen sowie unter infektiösen Bedingungen während einer bakteriellen Pneumonie zu untersuchen.

Dieser deskriptive Teil der Arbeit liefert eine Grundlage sowie Vergleichswerte für weitergehende funktionelle Studien, die sich mit der Lungenphysiologie unter gesunden und inflammatorischen Bedingungen befassen.

Die Unterschiede in den respiratorischen Immunantworten der verschiedenen Inzucht-Stämme, die in der Literatur immer wieder dokumentiert wurden, sind offensichtlich auch auf die quantitative und funktionelle Variabilität der leukozytären Subpopulationen zurückzuführen.

Es ist die erste Arbeit, die DC, Makrophagen und innate Leukozyten quantitativ vergleicht sowie deren Zytokinproduktionspotential vergleicht. Für die quantitativ optimale Gewinnung von respiratorischen Immunzellen aus Mausgewebe bieten die Ergebnisse ebenfalls eine Grundlage.

Die Methodik wurde weiterführend zur Analyse der gram-negativen Pneumonie (*Klebsiella pneumoniae*) eingesetzt. In dieser wurden die Veränderungen der großen respiratorischen Leukozytenpopulationen sowie im Besonderen der Dendritischen Zellpopulationen unter inflammatorischen Bedingungen näher untersucht.

Von besonderem Interesse ist hierbei die festgestellte ausgeprägte Heterogenität in der Gruppe der respiratorischen DC, unter denen vor allem die pDC in zukünftigen Projekten auf funktioneller Ebene näher untersucht werden sollten.

Die Immunantwort während einer *Klebsiella* Pneumonie ist dabei modulierbar.

Therapeutika, die durch den TLR-Signalweg wirken, haben einen deutlichen Einfluss auf die Zytokinausschüttung respiratorischer Leukozyten gezeigt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen könnten sich Ansätze für alternative Behandlungsstrategien für bakterielle Pneumonien ergeben, die angesichts zunehmender Antibiotika-Resistenzen nötig werden.





# Summary

It is the aim of this project was to analyze the heterogeneity and modulation of respiratory leukocyte subsets in the most important inbred mouse strains under non-infectious conditions as well as in the model of gram-negative pneumonia. To elucidate the role of respiratory dendritic cells was of particular importance in this context.

The results of the descriptive part provide reference values for further functional studies on the field of inflammation in the lung and lung physiology in general.

The study shows major differences in the quantity and quality of respiratory immune response in different mouse strains as described before in the literature. This results apparently from genetically variance causing quantitative and functional differences among leukocyte subpopulations in the mouse lung.

As far as we know this is the first work describing quantitative differences between mouse inbred strains regarding dendritic cells, macrophages as well as innate leukocytes and analyzing their specific cytokine potential. Furthermore this study provides basic data for optimal selection of inbred mice representing human phenotypes and to plan the setup of ex vivo experiments using extremely rare lung leukocyte subsets. The method of multicolor-FACS-analysis was used to further investigate lung leukocyte subsets in the context of gram-negative pneumonia (*Klebsiella pneumonia*). Quantitative changes of leukocyte subpopulations with special consideration of respiratory dendritic cell subsets during progressive inflammation were analyzed in detail.

Attention should be paid to the distinct quantitative and functional heterogeneity among the populations of respiratory dendritic cells. Based on the data of the thesis submitted herewith the role of pDC could be of particular interest in prospective functional studies.

Furthermore, the inflammatory immune response during *Klebsiella pneumonia* can be modulated by TLR-signaling molecules. The study shows a distinct influence of therapeutics on cytokine production of respiratory leukocytes.

In the face of emerging bacterial resistance against antibiotic therapy these data could provide an approach to alternative treatment strategies of bacterial pneumonia.



# Abkürzungsverzeichnis

<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance; Varianzanalyse
<b>APC</b>	Antigen-präsentierende Zelle
<b>BAL</b>	Broncho-alveoläre Lavage
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
<b>COPD</b>	chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
<b>CD</b>	„Cluster of differentiation“; Unterscheidungsgruppen
<b>cDC</b>	konventionelle Dendritische Zelle
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
<b>CFU</b>	Colony-Forming Unit
<b>DC</b>	Dendritische Zelle
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell-Sorting; Durchflusszytometrie
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MACS</b>	Magnetische Zell Separation
<b>mDC</b>	myeloide Dendritische Zelle
<b>MoDC</b>	Monozytische Dendritische Zelle

<b>mPDCA</b>	mouse plasmacytoid dendritic cell antigen 1
<b>Mph</b>	Makrophagen
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>pDC</b>	plasmazytoide Dendritische Zelle
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>RDC</b>	respiratorische Dendritische Zelle
<b>Siglech</b>	sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin H
<b>TLR</b>	Toll like Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumor-Nekrose-Faktor

# Abbildungsverzeichnis

1.1.1	Feinstruktur der humanen Lunge . . . . .	2
1.3.1	Pathogenitätsfaktoren von <i>Klebsiella pneumoniae</i> . . . . .	5
1.7.1	Übersicht der pulmonalen DC Subsets und Makrophagen sowie ihrer wichtigsten Oberflächenmarker . . . . .	13
2.2.1	Versuchsaufbau und Arbeitsschritte zur Analyse der T-Zellproliferation im transgenen OVA-Modell . . . . .	30
2.2.2	Prinzip der Zytokinmessung mittels FlowCytomix System und Darstellung der maximal verwendbaren Bead Populationen, aufgeteilt nach Größe und Fluoreszenzintensität in APC . . . . .	32
2.2.3	Darstellung der stattfindenden Reaktion bei Durchführung der BCA-Methode zur Proteinbestimmung . . . . .	33
2.2.4	Gating der Respiratorischen Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats und der BAL . . . . .	35
2.2.5	Gating der Lymphozyten und Lineage-negativen Leukozyten in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats . . . . .	35
2.2.6	Gating der regulatorischen T-Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats . . . . .	36
2.2.7	Gating der DC-Gesamtpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats . . . . .	37
2.2.8	Gating der DC-Subpopulation in der durchflusszytometrischen Analyse murinen Lungenhomogenats . . . . .	38
2.2.9	Formel zur Berechnung absoluter Zellzahlen in einem durchflusszytometrisch aufgenommenen Sample aus einem TruCount Tube . . . . .	38
2.2.10	Auswertungsschema der Mäuse aus Klebsiella-infizierten Tieren, welche im Rahmen der Kooperation mit AG Lohmeyer, Innere Medizin, Universitätsklinikum Gießen gewonnen wurden . . . . .	41

3.1.1	Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von Leukozyten-subpopulationen zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen mittels <i>Multicolor</i> -Analyse . . . . .	44
3.1.2	Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von respiratorischen DC- Subpopulationen zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen mittels <i>Multicolor</i> -Analyse . . . . .	45
3.1.3	Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von respiratorischen Leukozyten-Subpopulationen mittels Multicolor-Analyse zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen (Bl6, BALB/c, 129Sv, C3H und DBA; $n \geq 8$ ) . .	46
3.1.4	Durchflusszytometrische Untersuchung der Zytokinproduktion von Microbead-aufgereinigten respiratorischen Leukozyten nach Stimulation mit CD3/28, CpG ODN 1826 und LPS mittels Cytometric Bead Array ( $n \geq 5$ )	47
3.1.5	Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von respiratorischen Foxp3 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zell- Subpopulationen mittels <i>Multicolor</i> -Analyse (extra-/intrazelluläre Färbung) zwischen fünf Inzucht-Mausstämmen (Bl6, BALB/c, 129Sv, C3H und DBA; $n \geq 5$ ) . . . . .	48
3.2.1	Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung der Lunge hinsichtlich Gesamtleukozyten, Makrophagen, Gesamt-DC und Neutrophilen mittels <i>Multicolor</i> -Analyse in Klebsiella-infizierten C57BL6/N Mäusen und gesunden Kontrolltieren . . . . .	49
3.2.2	Histologische H&E Präparate Klebsiella-infizierter Mäuse 48 h und 5 Tage nach Infektion sowie dazugehöriger Kontrolltiere . . . . .	50
3.2.3	Durchflusszytometrische quantitative Untersuchung von CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> MHCII <sup>neg/low</sup> mittels <i>Multicolor</i> -Analyse . . . . .	51
3.3.1	Durchflusszytometrische Untersuchung putativer pDC mittels <i>Multicolor</i> -Analyse . . . . .	52
3.3.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit gesorteter DC-Subpopulationen mittels <i>Multicolor</i> -Analyse . . . . .	53
3.3.3	Untersuchung mit ODN-stimulierter DC-Subpopulationen mittels CBA (Cytometric Bead Array) . . . . .	54
3.4.1	CD4 T-Zellproliferation nach Stimulation mit OVA durch verschiedene DC-Subpopulationen verglichen mit Kontrollen ohne OVA bzw. ohne Zugabe von DC ( $n \geq 3$ ) . . . . .	55
3.5.1	Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsmarkers CD86 auf der Oberfläche definierter respiratorischer DC-Subpopulationen in Klebsiella-infizierten C57BL6/N Mäusen sowie in nicht-infizierten Kontrolltieren .	56
3.5.2	Durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsmarkers MHCII auf der Oberfläche definierter respiratorischer DC-Subpopulationen in Klebsiella-infizierten C57BL6/N Mäusen sowie in nicht-infizierten Kontrolltieren .	57

3.6.1	Untersuchung von Leukozyten aus 24h und 7 Tagen mit zwei verschiedenen Dosierungen Imiquimod behandelten C57BL6/N Mäusen mittels CBA . . . . .	59
-------	--	----





# Tabellenverzeichnis

1.4.1	Anteil von Pneumonien von durch <i>Klebsiella</i> bedingten nosokomialen Infektionen . . . . .	6
1.5.1	Übersicht und Vergleich gängiger Infektionsmethoden für Modelle muriner Atemwegsinfektionen . . . . .	9
1.7.1	Übersicht ausgewählter pulmonaler DC-Subsets und ihrer bisher beschriebenen Funktionen . . . . .	15
2.1.1	Verwendete Geräte und Zubehör . . . . .	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial . . . . .	19
2.1.3	Versuchstiere . . . . .	20
2.1.4	Verwendete Fluorochrome und ihre Extinktions/Emmissionswerte . . . .	21
2.1.5	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in FITC . . .	21
2.1.6	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in PE . . .	23
2.1.7	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in PE-Cy7 .	23
2.1.8	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in PerCP-Cy5.5 . . . . .	23
2.1.9	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in APC . . .	24
2.1.10	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in APC-Cy7 .	24
2.1.11	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für FACS-Messungen in Pacific Blue . . . . .	24
2.1.12	Compensation Beads (FACS-Kompensation) . . . . .	25
2.1.13	Verwendete Chemikalien . . . . .	25
2.1.14	Kits für intrazellulär-Färbungen und Zytokinmessungen . . . . .	26
2.2.1	Verwendete Antikörper/Fluorochrome für die Färbung leukozytärer Subpopulation der murinen Lunge für anschließende durchflusszytometrische Analyse. . . . .	34



# Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K. and Lichtman, A. H. (2005). *Cellular and molecular immunology*. Saunders, Philadelphia and PA, 5 edition.
- Allan, R. S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C. M., Villadangos, J. A., Zhan, Y., Lew, A. M., Shortman, K., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient ctl priming. *Immunity*, 25(1):153–162.
- Alvarez, D., Merino, S., Tomás, J. M., Benedí, V. J., and Albertí, S. (2000). Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide o side chain-deficient klebsiella pneumoniae clinical isolates. *Infection and immunity*, 68(2):953–955.
- Anh, D. B. T., Faisca, P., and Desmecht, D. J.-M. (2006). Differential resistance/susceptibility patterns to pneumovirus infection among inbred mouse strains. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 291(3):L426–35.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.-J., Brière, F., and Trinchieri, G. (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(12):6466–6477.
- Avrameas, S. and Guilbert, B. (1971). A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *European journal of immunology*, 1(5):394–396.
- Bagley, S. T., Seidler, R. J., Talbot, H. W., and Morrow, J. E. (1978). Isolation of klebsiellae from within living wood. *Applied and environmental microbiology*, 36(1):178–185.
- Balamayooran, G., Batra, S., Fessler, M. B., Happel, K. I., and Jeyaseelan, S. (2010). Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 43(1):5–16.

- Bals, R. and Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 23(2):327–333.
- Barlow, J. L. and McKenzie, A. N. J. (2011). Nuocytes: expanding the innate cell repertoire in type-2 immunity. *Journal of leukocyte biology*, 90(5):867–874.
- Beauchamp, N. M., Busick, R. Y., and Alexander-Miller, M. A. (2010). Functional divergence among cd103+ dendritic cell subpopulations following pulmonary poxvirus infection. *Journal of virology*, 84(19):10191–10199.
- Bhan, U., Ballinger, M. N., Zeng, X., Newstead, M. J., Cornicelli, M. D., and Standiford, T. J. (2010). Cooperative interactions between tlr4 and tlr9 regulate interleukin 23 and 17 production in a murine model of gram negative bacterial pneumonia. *PloS one*, 5(3):e9896.
- Björck, P. (2001). Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood*, 98(13):3520–3526.
- Blasius, A. L. and Colonna, M. (2006). Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of siglec-h. *Trends in immunology*, 27(6):255–260.
- Bonnefoy, F., Couturier, M., Clauzon, A., Rémy-Martin, J.-P., Gaugler, B., Tiberghien, P., Chen, W., Saas, P., and Perruche, S. (2011). Tgf-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in th17 commitment. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(11):6157–6164.
- Bosio, C. M., Bielefeldt-Ohmann, H., and Belisle, J. T. (2007). Active suppression of the pulmonary immune response by francisella tularensis schu4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(7):4538–4547.
- Brawand, P., Fitzpatrick, D. R., Greenfield, B. W., Brasel, K., Maliszewski, C. R., and Smedt, T. d. (2002). Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature apcs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(12):6711–6719.
- Broeckaert, F., Clippe, A., Wattiez, R., Falmagne, P., and Bernard, A. (2003). Lung hyperpermeability, clara-cell secretory protein (cc16), and susceptibility to ozone of five inbred strains of mice. *Inhalation toxicology*, 15(12):1209–1230.
- Broug-Holub, E., Toews, G. B., van Iwaarden, J. F., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Paine, R., and Standiford, T. J. (1997). Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine klebsiella pneumonia: elimination of alveolar macrophages

- increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infection and immunity*, 65(4):1139–1146.
- Brown, C. and Seidler, R. J. (1973). Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Applied microbiology*, 25(6):900–904.
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompарт, C. M., Albertí, S., and Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, 72(12):7107–7114.
- Carbone, F. R., Belz, G. T., and Heath, W. R. (2004). Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident dcs in peripheral t-cell tolerance and immunity. *Trends in immunology*, 25(12):655–658.
- Clauss, W. and Clauss, C. (2007). *Tierphysiologie kompakt*. Bachelor. Elsevier Spektrum Akad. Verl, Heidelberg and München, 1 edition.
- Cooper, K. D., Duraiswamy, N., Hammerberg, C., Allen, E., Kimbrough-Green, C., Dillon, W., and Thomas, D. (1993). Neutrophils, differentiated macrophages, and monocyte/macrophage antigen presenting cells infiltrate murine epidermis after uv injury. *The Journal of investigative dermatology*, 101(2):155–163.
- Curtis, M. M. and Way, S. S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 126(2):177–185.
- Daniels, C. B., Barr, H. A., and Nicholas, T. E. (1989). A comparison of the surfactant associated lipids derived from reptilian and mammalian lungs. *Respiration physiology*, 75(3):335–347.
- Davis, J. K., Thorp, R. B., Parker, R. F., White, H., Dziedzic, D., D’Arcy, J., and Cassell, G. H. (1986). Development of an aerosol model of murine respiratory mycoplasmosis in mice. *Infection and immunity*, 54(1):194–201.
- del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., and Förster, R. (2007). Cd103- and cd103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to cd4+ and cd8+ t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(11):6861–6866.
- Delclaux, C. and Azoulay, E. (2003). Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *The European respiratory journal. Supplement*, 42:10s–14s.
- DeMaria, T. F. and Kapral, F. A. (1978). Pulmonary infection of mice with *staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 21(1):114–123.

- Desch, A. N., Randolph, G. J., Murphy, K., Gautier, E. L., Kedl, R. M., Lahoud, M. H., Caminschi, I., Shortman, K., Henson, P. M., and Jakubzick, C. V. (2011). Cd103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *The Journal of experimental medicine*, 208(9):1789–1797.
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*, 8(9):871–874.
- Fierer, J., Walls, L., Eckmann, L., Yamamoto, T., and Kirkland, T. N. (1998). Importance of interleukin-10 in genetic susceptibility of mice to coccidioides immitis. *Infection and immunity*, 66(9):4397–4402.
- Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacology & therapeutics*, 60(1):39–62.
- Fuchs, S., Hollins, A. J., Laue, M., Schaefer, U. F., Roemer, K., Gumbleton, M., and Lehr, C.-M. (2003). Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-c. *Cell and tissue research*, 311(1):31–45.
- Fung, H. B. and Monteagudo-Chu, M. O. (2010). Community-acquired pneumonia in the elderly. *The American journal of geriatric pharmacotherapy*, 8(1):47–62.
- Garnier, C. v. and Nicod, L. P. (2009). Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss medical weekly*, 139(13-14):186–192.
- Garvy, B. A. and Harmsen, A. G. (1996). The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation*, 20(5):499–512.
- Gerberick, G. F., Cruse, L. W., Ryan, C. A., Hulette, B. C., Chaney, J. G., Skinner, R. A., Dearman, R. J., and Kimber, I. (2002). Use of a b cell marker (b220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 68(2):420–428.
- GeurtsvanKessel, C. H. and Lambrecht, B. N. (2008). Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal immunology*, 1(6):442–450.
- Gosselin, D., DeSanctis, J., Boulé, M., Skamene, E., Matouk, C., and Radzioch, D. (1995). Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with pseudomonas aeruginosa. *Infection and immunity*, 63(9):3272–3278.
- Greenberger, M. J., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Bramson, J., Gauldie, J., Graham, F. L., Hitt, M., Danforth, J. M., and Standiford, T. J. (1996). Il-12 gene therapy protects mice in lethal klebsiella pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(7):3006–3012.

- Greenberger, M. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Danforth, J. M., Goodman, R. E., and Standiford, T. J. (1995). Neutralization of il-10 increases survival in a murine model of klebsiella pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(2):722–729.
- Gregorio, J., Meller, S., Conrad, C., Di Nardo, A., Homey, B., Lauerma, A., Arai, N., Gallo, R. L., Digiovanni, J., and Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type i interferons. *The Journal of experimental medicine*, 207(13):2921–2930.
- Gruenheid, S. and Gros, P. (2010). Forward genetic dissection of innate response to infection in inbred mouse strains: selected success stories. *Clinical and experimental immunology*, 162(3):393–401.
- Hackstein, H., Hagel, N., Knoche, A., Kranz, S., Lohmeyer, J., Wulffen, W. v., Kershaw, O., Gruber, A. D., Bein, G., and Baal, N. (2012a). Skin tlr7 triggering promotes accumulation of respiratory dendritic cells and natural killer cells. *PloS one*, 7(8):e43320.
- Hackstein, H., Wachtendorf, A., Kranz, S., Lohmeyer, J., Bein, G., and Baal, N. (2012b). Heterogeneity of respiratory dendritic cell subsets and lymphocyte populations in inbred mouse strains. *Respiratory research*, 13:94.
- Happel, K. I., Dubin, P. J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L. J., Odden, A. R., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., and Kolls, J. K. (2005). Divergent roles of il-23 and il-12 in host defense against klebsiella pneumoniae. *The Journal of experimental medicine*, 202(6):761–769.
- Herold, S., Tabar, T. S., Janssen, H., Hoegner, K., Cabanski, M., Lewe-Schlosser, P., Albrecht, J., Driever, F., Vadasz, I., Seeger, W., Steinmueller, M., and Lohmeyer, J. (2011). Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of il-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(10):1380–1390.
- Ho, A. W. S., Prabhu, N., Betts, R. J., Ge, M. Q., Dai, X., Hutchinson, P. E., Lew, F. C., Wong, K. L., Hanson, B. J., Macary, P. A., and Kemeny, D. M. (2011). Lung cd103+ dendritic cells efficiently transport influenza virus to the lymph node and load viral antigen onto mhc class i for presentation to cd8 t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(11):6011–6021.
- Höffken, G., Lorenz, J., Kern, W., Welte, T., Bauer, T., Dalhoff, K., Dietrich, E., Ewig, S., Gastmeier, P., Grabein, B., Halle, E., Kolditz, M., Marre, R., and Sitter, H. (2005). S3-leitlinie zu ambulant erworbener pneumonie und tiefen atemwegsinfektionen. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 59(9):612–664.

- Hunt, D., Wilson, J. E., Weih, K. A., Ishido, S., Harton, J. A., Roche, P. A., and Drake, J. R. (2012). *Francisella tularensis* elicits il-10 via a pge<sub>2</sub>-inducible factor, to drive macrophage march1 expression and class ii down-regulation. *PloS one*, 7(5):e37330.
- Jakubzick, C., Tacke, F., Ginhoux, F., Wagers, A. J., van Rooijen, N., Mack, M., Merad, M., and Randolph, G. J. (2008). Blood monocyte subsets differentially give rise to cd103<sup>+</sup> and cd103<sup>-</sup> pulmonary dendritic cell populations. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5):3019–3027.
- Janeway, C. and Murphy, K. P. (2009). *Janeway Immunologie*. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg, 7 edition.
- Jeyaseelan, S., Young, S. K., Yamamoto, M., Arndt, P. G., Akira, S., Kolls, J. K., and Worthen, G. S. (2006). Toll/il-1r domain-containing adaptor protein (tirap) is a critical mediator of antibacterial defense in the lung against *klebsiella pneumoniae* but not *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(1):538–547.
- Johnson, P., Greenbaum, L., Bottomly, K., and Trowbridge, I. S. (1989). Identification of the alternatively spliced exons of murine cd45 (t200) required for reactivity with b220 and other t200-restricted antibodies. *The Journal of experimental medicine*, 169(3):1179–1184.
- Kabha, K., Nissimov, L., Athamna, A., Keisari, Y., Parolis, H., Parolis, L. A., Grue, R. M., Schlepper-Schafer, J., Ezekowitz, A. R., and Ohman, D. E. (1995). Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, 63(3):847–852.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine*, 194(6):863–869.
- Kim, T. S. and Braciale, T. J. (2009). Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic cd8<sup>+</sup> t cell responses. *PloS one*, 4(1):e4204.
- Köhler, W. and Mochmann, H. (1987). Carl friedländer (1847-1887) und die entdeckung des "pneumonicoccus"—zum gedenken an seinen 100. todestag. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung*, 81(12):615–618.
- Koyasu, S. and Moro, K. (2011). Innate th2-type immune responses and the natural helper cell, a newly identified lymphocyte population. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(2):109–114.



- Kühn, I., Ayling-Smith, B., Tullus, K., and Burman, L. G. (1993). The use of colonization rate and epidemic index as tools to illustrate the epidemiology of faecal enterobacteriaceae strains in swedish neonatal wards. *The Journal of hospital infection*, 23(4):287–297.
- Kumar, V. and Chhibber, S. (2011). Acute lung inflammation in klebsiella pneumoniae b5055-induced pneumonia and sepsis in balb/c mice: a comparative study. *Inflammation*, 34(5):452–462.
- Laichalk, L. L., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Danforth, J. M., Bailie, M. B., and Standiford, T. J. (1996). Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine klebsiella pneumonia. *Infection and immunity*, 64(12):5211–5218.
- Lam-Yuk-Tseung, S. and Gros, P. (2003). Genetic control of susceptibility to bacterial infections in mouse models. *Cellular microbiology*, 5(5):299–313.
- Lambrecht, B. N. and Hammad, H. (2012). Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annual review of immunology*, 30:243–270.
- Lambrecht, B. N., Salomon, B., Klatzmann, D., and Pauwels, R. A. (1998). Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(8):4090–4097.
- Lande, R. and Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183:89–103.
- Lehnert, H. and Werdan, K. (2006). *Innere Medizin - essentials: Intensivkurs zur Weiterbildung : 481 Tabellen*. Essentials. Thieme, Stuttgart [u.a.], 4 edition.
- Lin, H.-H., Stacey, M., Stein-Streilein, J., and Gordon, S. (2010). F4/80: the macrophage-specific adhesion-gpcr and its role in immunoregulation. *Advances in experimental medicine and biology*, 706:149–156.
- Liu, Y.-J. (2005). Ipc: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual review of immunology*, 23:275–306.
- Loschko, J., Heink, S., Hackl, D., Dudziak, D., Reindl, W., Korn, T., and Krug, A. B. (2011). Antigen targeting to plasmacytoid dendritic cells via siglec-h inhibits th cell-dependent autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(12):6346–6356.

- Martin, M. and Resch, K. (2009). *Immunilogie*. E. Ulmer, Stuttgart.
- Matsuzaki, G. and Umemura, M. (2007). Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiology and immunology*, 51(12):1139–1147.
- Matta, B. M., Castellaneta, A., and Thomson, A. W. (2010). Tolerogenic plasmacytoid dc. *European journal of immunology*, 40(10):2667–2676.
- McGill, J., van Rooijen, N., and Legge, K. L. (2008). Protective influenza-specific cd8 t cell responses require interactions with dendritic cells in the lungs. *The Journal of experimental medicine*, 205(7):1635–1646.
- Meyer, K. C. (2010). The role of immunity and inflammation in lung senescence and susceptibility to infection in the elderly. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 31(5):561–574.
- Mizgerd, J. P. and Skerrett, S. J. (2008). Animal models of human pneumonia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 294(3):L387–98.
- Moll, K.-J. and Moll, M. (2006). *Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog*. Elsevier, Urban und Fischer, München and Jena, 18 edition.
- Moore, T. A. and Standiford, T. J. (1998). The role of cytokines in bacterial pneumonia: an inflammatory balancing act. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 110(4):297–305.
- Moyes, C. D. and Schulte, P. M. (2008). *Tierphysiologie*. Pearson Studium, München.
- Neill, D. R. and McKenzie, A. N. J. (2011). Nuocytes and beyond: new insights into helminth expulsion. *Trends in parasitology*, 27(5):214–221.
- Neill, D. R., Wong, S. H., Bellosi, A., Flynn, R. J., Daly, M., Langford, T. K. A., Bucks, C., Kane, C. M., Fallon, P. G., Pannell, R., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464(7293):1367–1370.
- Nissen, M. D. (2007). Congenital and neonatal pneumonia. *Paediatric respiratory reviews*, 8(3):195–203.
- Panknin HT (2001). : Nosokomiale infektionen auf operativen intensivstationen – ursachen und prävention. *Medizin im Dialog 1/2001.*, 1.
- Parker, J. C. and Townsley, M. I. (2004). Evaluation of lung injury in rats and mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 286(2):L231–46.

- Petrosillo, N., Giannella, M., Lewis, R., and Viale, P. (2013). Treatment of carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae: the state of the art. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(2):159–177.
- Plantinga, M., Guillems, M., Vanheerswynghe, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B. N. (2013). Conventional and monocyte-derived cd11b(+) dendritic cells initiate and maintain t helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*, 38(2):322–335.
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., and Ullmann, U. (2001). Incidence of klebsiella species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and environmental microbiology*, 67(7):3325–3327.
- Podschun, R. and Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11(4):589–603.
- Randall, D., Burggren, W., French, K., Eckert, R., and Apfelbach, R. (2000). *Tierphysiologie: 55 Tabellen*. Thieme, Stuttgart [u.a.], 3 edition.
- Ratjen, F., Havers, W., and Braun, J. (1999). Intrapulmonary protein leakage in immunocompromised children and adults with pneumonia. *Thorax*, 54(5):432–436.
- Rink, L., Haase, H., and Kruse, A. (2011). *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum, Heidelberg, 1 edition.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of experimental medicine*, 180(1):83–93.
- Rosen, M. J. (2008). Pulmonary complications of hiv infection. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 13(2):181–190.
- Ruan, S., Young, E., Luce, M. J., Reiser, J., Kolls, J. K., and Shellito, J. E. (2006). Conditional expression of interferon-gamma to enhance host responses to pulmonary bacterial infection. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 19(4):251–257.
- Sahly, H., Navon-Venezia, S., Roesler, L., Hay, A., Carmeli, Y., Podschun, R., Hennequin, C., Forestier, C., and Ofek, I. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(9):3029–3034.

- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179(4):1109–1118.
- Schaberg, T. and Ewig, S. (2001). *Pneumonien: Diagnostik, Therapie und Prophylaxe ; 34 Tabellen*. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Schiebler, T. H. and Korf, H.-W. (2007). *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs*. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 10 edition.
- Schoppet, M., Bubert, A., and Huppertz, H. I. (2000). Dendritic cell function is perturbed by yersinia enterocolitica infection in vitro. *Clinical and experimental immunology*, 122(3):316–323.
- Schultz, M. J. and van der Poll, T. (2002). Modulation of pulmonary innate immunity during bacterial infection: animal studies. *Archivum immunologiae et therapiarum experimentalis*, 50(3):159–167.
- Seidler, R. J., Knittel, M. D., and Brown, C. (1975). Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on klebsiella pneumoniae from clinical and environmental sources. *Applied microbiology*, 29(6):819–825.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., and Pamer, E. G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology*, 26:421–452.
- Soares, A. C., Souza, D. G., Pinho, V., Vieira, A. T., Barsante, M. M., Nicoli, J. R., and Teixeira, M. (2003). Impaired host defense to klebsiella pneumoniae infection in mice treated with the pde4 inhibitor rolipram. *British journal of pharmacology*, 140(5):855–862.
- Speert, D. P. (2006). Bacterial infections of the lung in normal and immunodeficient patients. *Novartis Foundation symposium*, 279:42–51; discussion 51–5, 216–9.
- Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Greenberger, M. J., Laichalk, L. L., and Strieter, R. M. (1996). Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *Journal of leukocyte biology*, 59(1):24–28.
- Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. i. morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5):1142–1162.

- Stotland, P. K., Radzioch, D., and Stevenson, M. M. (2000). Mouse models of chronic lung infection with *pseudomonas aeruginosa*: models for the study of cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 30(5):413–424.
- Sung, S.-S. J., Fu, S. M., Rose, C. E., Gaskin, F., Ju, S.-T., and Beaty, S. R. (2006). A major lung cd103 (alphae)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing langerin and tight junction proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(4):2161–2172.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral nk and cd8(+) t cell accrual. *Immunity*, 33(6):955–966.
- Takagi, H., Fukaya, T., Eizumi, K., Sato, Y., Sato, K., Shibazaki, A., Otsuka, H., Hijikata, A., Watanabe, T., Ohara, O., Kaisho, T., Malissen, B., and Sato, K. (2011). Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and t cell immunity in vivo. *Immunity*, 35(6):958–971.
- Tateda, K., Moore, T. A., Deng, J. C., Newstead, M. W., Zeng, X., Matsukawa, A., Swanson, M. S., Yamaguchi, K., and Standiford, T. J. (2001). Early recruitment of neutrophils determines subsequent t1/t2 host responses in a murine model of legionella pneumophila pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(5):3355–3361.
- Tateno, H., Li, H., Schur, M. J., Bovin, N., Crocker, P. R., Wakarchuk, W. W., and Paulson, J. C. (2007). Distinct endocytic mechanisms of cd22 (siglec-2) and siglec-f reflect roles in cell signaling and innate immunity. *Molecular and cellular biology*, 27(16):5699–5710.
- Villadangos, J. A. and Heath, W. R. (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the langerhans cells paradigm. *Seminars in immunology*, 17(4):262–272.
- Vooght, V. d., Vanoirbeek, J. A. J., Luyts, K., Haenen, S., Nemery, B., and Hoet, P. H. M. (2010). Choice of mouse strain influences the outcome in a mouse model of chemical-induced asthma. *PloS one*, 5(9):e12581.
- Wang, E., Ouellet, N., Simard, M., Fillion, I., Bergeron, Y., Beauchamp, D., and Bergeron, M. G. (2001). Pulmonary and systemic host response to streptococcus pneumoniae and klebsiella pneumoniae bacteremia in normal and immunosuppressed mice. *Infection and Immunity*, 69(9):5294–5304.
- Warnke, P. H., Lott, A. J. S., Sherry, E., Wiltfang, J., and Podschun, R. (2012). The ongoing battle against multi-resistant strains: In-vitro inhibition of hospital-acquired

mrsa, vre, pseudomonas, esbl e. coli and klebsiella species in the presence of plant-derived antiseptic oils. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*.

White, D. A. (1995). Pulmonary infection in the immunocompromised patient. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*, 7(2):78–87.

Wikstrom, M. E. and Stumbles, P. A. (2007). Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunology and cell biology*, 85(3):182–188.

Zhang, P., Summer, W. R., Bagby, G. J., and Nelson, S. (2000). Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunological reviews*, 173:39–51.

Zhu, W. and Gilmour, M. I. (2009). Comparison of allergic lung disease in three mouse strains after systemic or mucosal sensitization with ovalbumin antigen. *Immunogenetics*, 61(3):199–207.

# Publikationsliste

Hackstein, H., Hagel, N., Knoche, A., Kranz, S., Lohmeyer, J., et al. (2012). Skin TLR7 Triggering Promotes Accumulation of Respiratory Dendritic Cells and Natural Killer Cells. *PLoS ONE*

Hackstein, H., Wachtendorf, A., Kranz, S., Lohmeyer, J., Bein, G., and Baal, N. (2012). Heterogeneity of respiratory dendritic cell subsets and lymphocyte populations in inbred mouse strains. *Respiratory research*, 13:94.





# Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierenschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



# Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein möchte ich mich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Betreuung meiner Doktorarbeit recht herzlich bedanken. Sein fachlicher Rat und seine Anregungen haben mich mein Promotionsprojekt immer wieder aus einem neuen Winkel betrachten lassen.

Frau Dr. Nelli Baal möchte ich meinen Dank aussprechen für die gründliche Einarbeitung im Labor, für unzählige Stunden der Zusammenarbeit, für ihre aufmunternden Worte und ihre scheinbar endlose Geduld. Sie war mir ein wunderbares Vorbild und hat mich immer angespornt. Aus der gemeinsamen Arbeit im Labor und wissenschaftlichen wie privaten Gesprächen mit ihr habe ich sehr viel für mein weiteres Leben mitgenommen.

Danken möchte ich auch Frau Gabriela Haley für die praktische und moralische Unterstützung bei den Experimenten. Ihre Hilfsbereitschaft, experimentelle Kompetenz und ihre freundliche, offene Art haben meine Zeit im Labor sehr bereichert.

Herrn Andreas Wachtendorf möchte ich für seine Hilfe bei den Probenaufbereitungen und FACS Analysen danken, für seine unkomplizierte Art und für sein Einspringen in Notsituationen, die sich durch Zeit- oder Personenmangel ergaben. Ohne ihn wäre vieles gar nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich Frau Bettina Gill und Frau Carolin Szardening-Kirchner dafür danken, dass sie immer für mich da waren und ich mich stets auf sie verlassen konnte.

Darüber hinaus danke ich auch meinen Mit-Doktoranden Erhan Yakut, Nicole Hagel und Håkon Sandvold für eine stets reibungslose Zusammenarbeit und gemeinsame Benutzung des Labors. Vielen Dank für die Gespräche an der Hood, die Rechenübungen und die Hilfe bei der ein oder anderen Präparation.

Meinem Lebenspartner Christoph Walesch möchte ich für Unterstützung bei vielen Computerproblemen bedanken sowie für die gestalterische Umsetzung meiner Arbeit. Ihm und meiner Familie möchte ich darüber hinaus dafür danken, dass sie in der Zeit meiner Promotion ein offenes Ohr für mich hatten und mich immer unterstützt haben.

Vielen Dank!



**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**